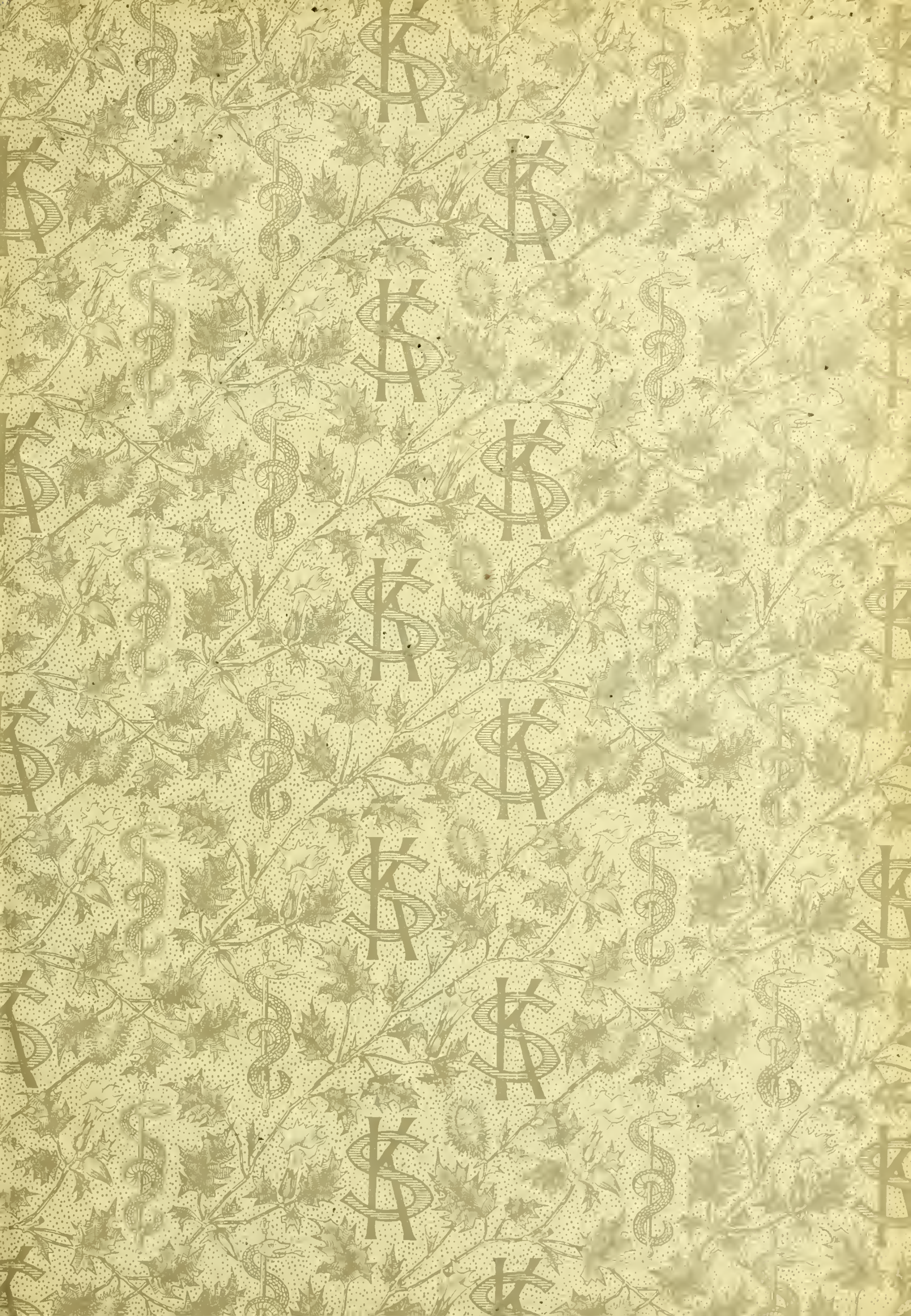
B. Pollack

Die Färbetechnik für das Nervensystem

Dritte Auflage

Verlag von S. Karger in Berlin



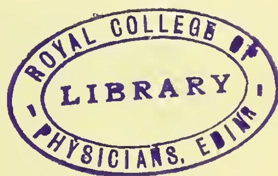
Die Färbetechnik

für das

Nervensystem.

Von

Dr. Bernhard Pollack,
Augenarzt in Berlin.



Dritte, wesentlich erweiterte Auflage.



BERLIN 1905.
VERLAG VON S. KARGER.
KARLSTRASSE 15.

Nach der zweiten Auflage erschien eine französische Übersetzung bei Carré & Naud in Paris, eine englische bei F. Bauermeister in Glasgow; eine italienische nach der dritten Auflage ist in Vorbereitung.

Druck von H. Klöppel, Quedlinburg.

Vorwort zur dritten Auflage.

Für die vorliegende neue Auflage, welche ich der seit längerer Zeit vergriffenen zweiten Auflage jetzt folgen lasse, sind trotz wesentlicher Änderungen in Inhalt und Form die leitenden Prinzipien die gleichen geblieben, wie sie es mir bei den früheren Ausgaben gewesen sind. Es waren wesentlich innere Gründe, die eine neue Auflage mir erst jetzt opportun erscheinen liessen; denn in dem letzten Lustrum hatte sich eine gewisse Stagnation in unserer Disziplin geltend gemacht — trotz reicher Arbeiten so vieler ernster Forscher —, die erst durch richtigere Einschätzung bereits vorhandener Färbungen und Schaffung neuer Methoden allmählich behoben werden konnte, unter denen die Methoden zur Darstellung der Neurofibrillen einen ersten Rang einnehmen dürften.

Es erscheint mir sicher, dass noch manches auch in der vorliegenden Darstellung und Anordnung der Korrektur fähig und bedürftig ist, und mit grösstem Danke werde ich alle diesbezüglichen Bemerkungen begrüssen; dennoch brachte es die spezielle Behandlung des Themas mit sich, dass manches erwähnt wurde, was dem Einen entbehrlich erscheint, manches fortblieb, was Andere vielleicht gern erwähnt gesehen hätten. Jede Methode hat ja ihre besonderen Anhänger, und selbst auf die scheinbar einfachste muss man erst viel eigene Mühe verwenden, bis man wirklich gute Resultate erhält. Um Gelegenheit zu geben, manche Arbeiten im Original nachzulesen, habe ich diesmal am Schlusse der verschiedenen Kapitel eine möglichst ausführliche Literaturangabe einschlägiger Arbeiten folgen lassen.

In die Zeit, in der ich die vorliegende Ausgabe abzuschliessen im Begriff bin, fällt das plötzliche Hinscheiden Carl Weigerts, des Mannes, der unser aller Lehrer gewesen und der, wie auf so vielen anderen Gebieten auch, gerade in unserem Gebiete der Nervenforschung sich so unvergängliche Verdienste erworben hat. Es ist mir ein tiefes Herzensbedürfnis, diesem Manne für Alles, was er mir zu jeder Zeit in wissenschaftlicher wie rein menschlicher Hinsicht zuteil werden liess, über das Grab hinaus meinen innigsten Dank nachzurufen.

BERLIN, im Herbst 1904.

B. Pollack.

Vorwort zur ersten Auflage.

Vorliegendes Büchlein wendet sich allein an diejenigen, welche sich mit mikroskopischen Untersuchungen des Zentralnervensystems beschäftigen; damit ist bereits gesagt, dass es nicht für Anfänger in der Histologie bestimmt ist und dass es kein Lehrbuch der Mikroskopie darstellen, kein solches ersetzen soll; im Gegenteil sind absichtlich eine ganze Reihe von Anweisungen fortgelassen worden, welche sich sonst in jeder histologischen Technik finden, oder sie sind nur so kurz angeführt, dass daraus hervorgeht, dass bereits gewisse Kenntnisse und Erfahrungen auf dem Gebiete mikroskopischer Technik vorausgesetzt werden.

Der eigentliche Zweck dieser Zusammenfassung sollte der sein, in handlicher Form nach Vorgang der vorzüglichen Technik von Goodall ein bequemes Nachschlagebüchlein den Interessenten in diesem Fache zu geben, welches ja durch die rege Tätigkeit der letzten Jahre allmählich zu grösster Bedeutung und Ausdehnung gelangt ist, so sehr, dass es nicht nur unmöglich ist, all die Methoden in ihrer oft grossen Kompliziertheit dem Gedächtnis einzuverleiben, sondern dass auch mehr als ein Menschenleben dazu gehörte, um nur all das, was neu publiziert wird, selbst nachzuprüfen.

Immerhin war es mein Bestreben, hauptsächlich das anzuführen, was mehr oder minder als gesicherter oder brauchbarer Besitz unseres Gebietes gelten kann; die Mängel, die durch die Schwierigkeit der Wahl sich ergeben mussten, möge man mir freundlich nachsehen. Es schien mir nützlich, manches kurz, manches ausführlicher darzustellen; so fand die Nisslsche Färbung, die Marchische Methode und Golgis Chromsilber-Methode ein genaueres Eingehen, so musste nun auch die Weigertsche Neurogliafärbung, welcher ausser in Weigerts grosser Arbeit noch in fast keiner Histologie (abgesehen von den Referaten in Zeitschriften) angegeben ist, die ihr gebührende Darstellung finden.

Der Übersichtlichkeit wegen wählte ich fast durchwegs die Rezeptform, wie sie sich in v. Kahldens Technik so ausgezeichnet bewährte; im übrigen bemühte ich mich, gewisse kritische Bemerkungen bei ver-

schiedenen Methoden anzufügen, wobei mir auch die freundliche Unterstützung meines Freundes Dr. E. Flatau zuteil wurde.

Zu aufrichtigstem Dank bin ich meinen hochverehrten Lehrern, den Herren Gehh.-R. Waldeyer und Weigert verpflichtet für das freundliche Interesse, welches sie mir in wohlwollendster Weise zuwandten: ihnen möge hiermit auch meine kleine Arbeit zugeeignet sein.

BERLIN, den 20. Februar 1897.
I. Anatomisches Institut.

Pollack.

Inhalt.

Seite

I. Die Technik der Gehirnsektion 1
Härtung des Gehirns zum Zwecke der Konservierung (Museumszweck) 7
Plastische Reproduktion pathol.-anatomischer Präparate 13
II. Härtungs- resp. Fixierungsflüssigkeiten für das zentrale und peripherische Nervensystem 15
Allgemeines über Härten und Färben 22
Die Untersuchung ungefärbten frischen Materials 24
Die Markierung der Stücke 25
Die Einbettung der Stücke 25
Mikrotome 32
Serienschnitte nach Weigert, Obregia und Apáthy 33
Serienlängsschnitte durch das ganze Rückenmark 37
Die Öle und Harze 39
III. Veränderungen des Gehirngewichtes nach Aufbewahrung desselben in verschiedenen Härtungsflüssigkeiten, speziell in Formollösungen 42
Zeichenapparat nach L. Edinger. Das Photographieren makroskopischer Präparate 44
IV. Die Färbungsmethoden. Allgemeine Prinzipien 46
Die Färbung A. der Nervenzellen 50
Die Golgische Methode 79
Die Ehrlichsche Methylenblau-Methode 89
B. der Markscheiden 97
C. der Axenzylinder und Neurofibrillen 113
D. der Neuroglia 136
Die Färbung des peripherischen Nervensystems 145
V. Allgemeine praktische Bemerkungen zur Bearbeitung des normalen und pathologischen Zentral- und peripherischen Nervensystems 150
VI. Register 155

I. Die Technik der Gehirnsektion.

Die Möglichkeit, das Zentralnervensystem der Vertebraten makroskopisch wie mikroskopisch untersuchen zu können, hat notwendigerweise die Erfüllung mehrerer Bedingungen zur Prämisse: in erster Linie die Eröffnung der Schädelkapsel resp. der Wirbelsäule, demnächst die Herausnahme der Organe aus diesen sie umgebenden Schutzhüllen (wozu auch die Dura mater zu rechnen ist), dann die Anlegung von gewissen Einschnitten zu möglichst genauer Durchsuchung aller inneren Teile und weiterhin zur Anfertigung von mikroskopischen Präparaten mit oder ohne Hülfe der Färbung.

Wenngleich nun der erste und zweite Vorgang relativ einfach und vor allen Dingen jedem Anatomen geläufig sind, so sei es doch gestattet, mit wenigen Worten den Prozess zu skizzieren.

Nachdem mittels des von einem Ohr zum andern reichenden und über den Scheitel gehenden Schnittes die Kopfhaut durchtrennt, danach nach vorn und hinten übergeklappt ist (bis zum Orbitalrand resp. Protuberantia occipitalis externa), wird die Schädelkalotte (nach Horizontaldurchschneidung der Temporalmuskeln) entfernt, und zwar entweder mittels der Säge oder, wie es in Frankreich meist geschieht, mittels des Meissels. Déjerine weist nicht mit Unrecht darauf hin, dass bei Anwendung der Säge leicht eine Verletzung der Hirnoberfläche stattfinden kann, zumal der Schädel ja im Laufe seiner Circumferenz verschiedene Dicke und Dichtigkeit darbietet, und er möchte deshalb die Säge nur auf die Fälle beschränkt wissen, wo bereits Frakturen etc. des Schädels stattgefunden hatten. Indessen scheint es mir, als wenn bei einiger Übung und Vorsicht schon unter genauer Berücksichtigung des sich verändernden Tons der Säge Läsionen ebenso leicht zu vermeiden sind, wie bei dem von Déjerine vorgezogenen Meissel.

Ist nun die Schädelkalotte entfernt, die Dura mater genügend auf äussere Abnormitäten und Veränderungen geprüft, so folgt zunächst die Trennung der Dura mittels Scheere, und zwar entweder mit dem Zirkulärschnitt oder besser mit den bekannten Kreuzschnitten, worauf man daran gehen kann, das Gehirn aus der Schädelhöhle loszulösen. Zu diesem Zwecke führt man die linke Hand unter die lobi frontales,

hebt vorsichtig das Organ hoch und durchschneidet mit dem Skalpell nacheinander die Nervenpaare an der Basis, die Vertebralarterien, löst das Kleinhirn los, durchtrennt endlich die Medulla oblongata (sive spinalis) und kann nun mit Unterstützung der rechten Hand das ganze Gehirn emporheben.

Dass bei all diesen Manipulationen jeder Zug, jede Zerrung völlig vermieden bleibe, kann nicht scharf genug betont werden; denn abgesehen davon, dass sonst leicht die Pedunculi verletzt werden, könnten solche Verletzungen auch Kunstprodukte mit verhängnisvollen Deutungen bei späteren Untersuchungen (Marchis Methode!) produzieren.

Die Eröffnung der Rachis und die Herausnahme der Medulla spinalis mit Durchtrennung der Wurzelpaare ist an sich einfach und bedarf keiner weiteren Exposition.

Es kann nicht genug darauf hingewiesen werden, wie wiehtig es ist, bei der Herausnahme von Gehirn und Rüekenmark und allen späteren Vornahmen vorsiehtig vorzugehen; denn viele Fälle, die in der Literatur als Abnormitäten besehrieben sind, sind erst künstlich geschaffen worden. So hat Ira von Gieson gezeigt, wie weit der Einfluss sehleehter Behandlung falsehe Bilder erzeugen kann, wie leieht z. B. künstliehe Heterotopien entstehen, ja es konnte sogar eine Verdoppelung des Rüekenmarks erzielt werden.

Welchen Manipulationen nun das Gehirn von dem Moment an unterliegt, wo es zuerst mit einer wirksamen Flüssigkeit (zur Fixierung resp. Härtung) in Berührung gekommen ist, sei weiter unten angeführt, nachdem jetzt zuvörderst der wichtige Vorgang der eigentlichen Gehirnsektion seinen Platz gefunden hat.

Während die normale Anatomie sich noch der alten Galenschen Methode im allgemeinen anschliesst, [1]) ist für die pathologische Anatomie seit ca. 50 Jahren durch R. Virchow eine neue Sektionstechnik geschaffen, welche bei möglichster Wahrung des Zusammenhangs der Teile eine vollständige Einsicht der Veränderungen geben soll, und zwar stellt sich die Virchowsche Methode der Gehirnsektion in ihren hauptsächlichen Zügen folgendermassen dar:

Nach Auseinanderziehen der Hemisphären in der Mantelspalte wird ein Schnitt senkrecht in das Corpus callosum seitlich von der Raphe angelegt zur Eröffnung der Cella media des Seitenventrikels. Zur Freilegung der vorderen resp. hinteren Hörner werden horizontale Schnitte in die Vorder- und Hinterlappen des Gehirns geführt. Das

[1]) Vergl. Siemerling-Edinger: Zeitschrift f. Psych. 1894 p. 349 ff.

Septum pellucidum wird mit der linken Hand hinter dem Foramen Monroi ergriffen, das Messer durch dieses Loch hindurchgeführt, das Corpus callosum schief nach vorn und oben durchschnitten.

Alle Teile (Corp. callos., Sept. pelluc., Fornix) werden vom Velum choroides abgezogen. Von vorn her fasst man mit dem Skalpellstiel unter das Velum, zieht dasselbe von der Zirbeldrüse und den Vierhügeln ab, und durch einen senkrechten langen Schnitt werden die Vierhügel und das Kleinhirn bis in den Aquaeductus Sylvi und den vierten Ventrikel gespalten.

Die Hemisphären werden durch Schnitte von innen nach aussen zerlegt, so dass jeder folgende Schnitt über die Mitte der vorhandenen Schnittfläche geführt und jede neue Hälfte immer wieder von neuem halbiert wird.

Seh- und Streifenhügel werden durch fächerförmig angelegte Radialschnitte, deren gemeinschaftlicher Ausgangspunkt der Hirnstiel ist, gespalten.

Die französische Methode gestattet eine genaue Lokalisation von Herdaffektionen und ist die gebräuchlichste für weitere mikroskopische Untersuchung; hiernach werden die von einander getrennten und von der Pia entblössten Hemisphären durch Frontalschnitte in mehrere Partien geteilt. Der I. Schnitt wird ca. 5 cm vor der Zentralfurche geführt, der II. 1 cm vor der Fissura perpendicularis int.; dadurch zerfällt die Hemisphäre in drei Abschnitte: Regio praefrontalis, Regio occipitalis und Regio-fronto-parietalis. Letztere wird durch 4 weitere Schnitte zerlegt: der erste geht durch die „Füsse“ der Stirnwindungen (coupe pédiculo-frontale), der zweite durch die vordere Zentralwindung (coupe frontale), der dritte durch die hintere Zentralwindung (coupe pariétale), der vierte durch die „Füsse“ der Scheitelwindungen (coupe pédiculo-pariétale).

Diese Methode von Pitres ist etwas modifiziert worden von Nothnagel, der nach Trennung der Hemisphären jede derselben durch partielle, von oben nach unten gehende Schnitte zerlegt, die im Wesentlichen parallel der Zentralfurche gehen; Ausgangspunkte für diese Schnitte sind Genu und Splenium Corporis callosi, unmittelbar vor bezw. hinter welches der Schnitt fällt. Im Ganzen gewinnt Nothnagel ebenso wie Pitres sechs Schnitte, die sich aber enger an gegebene feste Punkte anschliessen und so gestatten, die zwischen je zwei Schnitten befindliche Partie des Zentrum ovale nach den an der Oberfläche befindlichen Hirnteilen mit einem einfachen Namen zu bezeichnen, und

zwar nennt er die Regionen des Zentrum ovale, von hinten nach vorn gerechnet:

1) Pars occipitalis,
2) — parietalis,
3) — centralis post.,
4) — — ant.,
5) — frontalis post.,
6) — — media,
7) — — ant.

Die **Methode von Meynert** ist zu dem Zweck erfunden worden, Wägungen der einzelnen Teile des Gehirns vornehmen zu können. Zerlegt wird hierbei das Gehirn in den Gehirnmantel, Hirnstamm und Kleinhirn; die Pia mater wird nicht entfernt.

Grosse Ausbreitung hat diese Art der Sektion nicht erlangt; andere noch angegebene Methoden (Nauwerk, Burkhardt und Byron Bramwell) dürfen wohl übergangen werden, und nur die von **Weigert empfohlene Kombination der Virchow'schen und Meynert'schen Methode** sei noch erwähnt. Die Ventrikel werden von oben eröffnet, die grossen Ganglien mittelst eines Bogenschnittes umschnitten, welcher das ganze Unterhorn eröffnet; die Hemisphären werden von aussen angeschnitten, und zwar bis zu den Zentralwindungen in Frontalschnitten, dann in Horizontalschnitten. Auf diese Weise kann das Gehirn stets wieder zusammengelegt werden. —

Die Zwecke, welche bei der Wahl der einen oder anderen Methode ins Auge zu fassen sind, sind zwar recht verschiedene, immerhin lassen sich doch nach Siemerling zwei Gesichtspunkte als hauptsächlich massgebende hinstellen. Bei Gehirnaffektionen, besonders aber bei den sog. Herderkrankungen, kommt es auf den Sitz und die Ausbreitung der Läsion an; in dieser Hinsicht muss die Schnittführung Rücksicht auf das Bedürfnis der eventuellen Lokalisation nehmen, und da die Fortschritte der letzten Zeit auf unserem Gebiete nur mit einer besonders ausgebildeten mikroskopischen Technik erreicht worden sind, so ist als Desiderat die Möglichkeit ausgedehntester mikroskopischer Untersuchung des Gehirns aufzustellen.

Das alte Postulat Virchow's, vor mehr als 50 Jahren aufgestellt: „Die Individualität des Falles muss die Methode der Untersuchung bestimmen", trifft wohl auf kein Organ mehr zu als auf das Gehirn.

Von diesem Standpunkt der Adaption der makroskopischen Sektion des Gehirns an die nachfolgende mikroskopische Untersuchung aus betrachtet, ergibt sich zuerst als allgemeines Gesetz, dass für jeden Fall eine Sektion als die zweckmässigste sich nicht aufstellen lässt, dann aber gewisse spezielle Gesichtspunkte.

Virchow's Sektion gestattet zwar makroskopisch einen genauen

Einblick in alle Teile, aber die Zerlegung in kleine Stücke, welche nur locker durch die Pia zusammenhängen, macht eine mikroskopische genaue Untersuchung fast unmöglich. Serienschnitte sind jedenfalls völlig ausgeschlossen. Aber auch die Zerlegung des Hirnmantels in einer stets wechselnden Schnittrichtung erschwert nicht selten die Bestimmung des Sitzes eines Herdes.

Die approximative Sicherheit der Methode, dass ein Gehirn im Inneren frei ist von gröberen Läsionen, reicht aber bei den für uns in Betracht kommenden Fällen heute nicht mehr aus.

Meynerts Methode eignet sich mehr für die normale Anatomie und zur Vornahme von Wägungen einzelner Teile, und sonst wo es sich um gesonderte Untersuchung des Hirnmantels und Hirnstammes handelt.

Pitres-Nothnagels Methode kommt hauptsächlich für die grosse Zahl innerer Organaffektionen in Anwendung.

Für spätere mikroskopische Untersuchung des Gehirns ist demnach am besten die französische Methode der Frontalschnitte anzuwenden, wobei letztere zunächst möglichst wenig zahlreich zu machen sind, besonders im Hirnstamm. Erst nach erfolgter Härtung lege man weitere Schnitte an.

In Bezug auf das Gehirngewicht des Menschen resp. einiger Tiere mögen hier wenige Angaben willkommen sein.[1]) Für die inneren Hirnhäute (samt dem in den Subarachnoidalräumen befindlichen Serum) berechnete Broca das Gewicht auf 55,8 resp. 48,7 gr. (beim Mann resp. Weib); das Gehirn selbst wiegt im Mittel:

1360 gr. beim Manne
1230 gr. beim Weibe
(nach anderen Angaben 1416 resp. 1260 gr.)
447,5 gr. beim Neugeborenen.

Hieraus folgt, dass das relative Gehirngewicht (d. h. das Verhältnis des Gehirngewichtes zum Gewichte des ganzen Körpers) etwa 1 : 40—60 (Erwachsene) resp. 1 : 8,3 (Neugeborene) (nach Mies 1 : 5,9) beträgt; das Gehirn des Neugeborenen ist demnach relativ weit grösser als das des Erwachsenen. Die Berechnung Thurnam's mit einem Verhältnis von 1 : 33 und 1 : 31,9 hat nach Obersteiner nur für sehr herabgekommene Erwachsene Geltung.

Das absolut schwerste Gehirn besitzt nicht der Mensch, sondern der grosse Walfisch, dessen Organ 6000—7000 gr. erreicht, dann

[1]) Vergl. auch Obersteiner, Anleitung etc. pag. 140 ff. (IV. Aufl.).

folgt der Elephant mit einem Gehirngewicht von za. 4—5000 gr., erst an dritter Stelle der Mensch.

Beim Pferde erreicht das Gewicht nur 680 gr., beim Gorilla za. 500 gr.

Wenn auch im allgemeinen gewisse Beziehungen zwischen Grösse des Gehirns und Intelligenz beim gesunden Menschen zu bestehen scheinen, so lassen sich doch keine allgemein gültigen Regeln hierfür aufstellen, wie die folgende Tabelle von Gehirngewichten berühmter Männer zeigt:

Turgenjew .	2012 gr.	Dirichlet . .	1530 gr.
Cuvier . .	1830 „	Gauss . .	1492 „
Abercrombie	1785 „	Broca . . .	1484 „
Volta . . .	1745 „	Dupuytren .	1437 „
Petrarca . .	1602 „	Liebig . .	1352 „
Schiller . .	1580 „	Dante . .	1320 „
	Gambetta .	1180 gr.	

Das Gehirngewicht Turgenjews also war demjenigen Gambettas um ca. 900 gr überlegen! Andererseits gehörte das schwerste bisher beschriebene Gehirn von 2850 gr Gewicht einem 21jährigen epileptischen Idioten an (v. Walsem). Während hier die äussere Oberfläche keine grossen Abweichungen von der Norm zeigte, wies der Hirnstamm eine Vergrösserung aller seiner Teile auf. Auch bei einfachen Arbeitern wurden Gehirne von ca. 2000 gr. Gewicht beobachtet. Wenn demnach also feste Regeln nicht gelten können, so ist das eine doch sicher, dass „das Hirngewicht einen gewissen Minimalwert (1000 resp. 900 gr) überschritten haben muss, damit die psychischen Funktionen in normaler Weise ablaufen können“ (Obersteiner).

Interessant sind die Ergebnisse der neuesten Forschungen Buschans, von denen einige hervorgehoben seien; danach besitzen die auf niederer Kulturstufe stehenden Völker ein leichteres Gehirn als die Kulturvölker, ebenso einen inhaltlich viel kleineren Schädel. Die Chinesen besitzen unter den Kulturnationen das schwerste Hirngewicht und den grössten Schädelbinnenraum. Einem grösseren Schädelbinnenraum bezw. einem grösseren Horizontalumfang des Schädels entspricht im allgemeinen ein schwereres Gehirn und eine entwickeltere Intelligenz. Die fortschreitende Kultur äussert ihren Einfluss auf das Gehirn durch dessen zunehmende Vergrösserung. Dass umgekehrt ein Rückgang der Kultur eine Verminderung des Schädelbinnenraums zur Folge hat, zeigt Ägypten, dessen Bevölkerung gegenwärtig einen bedeutend geringeren Schädelinhalt hat, als zur Blütezeit des Landes unter den Pharaonen.

Broca hat den mittleren Inhalt von 115 Schädeln aus dem 12. Jahrhundert auf 1426 Kubikzentimeter, den von 125 Schädeln aus dem 19. Jahr-

hundert (durchwegs von Parisern) auf 1461,5 Kubikzentimeter berechnet und schloss daraus bekanntermassen auf eine entsprechende Zunahme des Gehirngewichts.

Die einzelnen Hemisphären sind fast immer gleich schwer (ausser bei Geisteskranken); bei Linkshändern soll nach Ogle die rechte Hemisphäre um einige Gramm überwiegen (bei Rechtshändern umgekehrt). Für das Gehirngewicht Irrsinniger hat Meynert ermittelt, dass dasselbe am geringsten bei Paralytikern, und danach bei chronischen Alkoholikern gefunden wird.

Dem Neurologen ist es oft von Wichtigkeit und Interesse, den Umfang des Schädelinnenraums zu kennen, um an der Hand davon auch gewisse Schlüsse zu ziehen. Die meisten der gebräuchlichen Kubierungsmethoden (mit Sand, Schrot etc.) von Welcker weisen nun, wie leicht verständlich, grosse Fehlerquellen auf, und als brauchbarstes Medium dürfte wohl das Wasser zu verwenden sein. Nach dem Vorschlag von Zanke füllt man beide Schädelteile: die abgeschnittene Kalotte und den basalen Teil aus einem volumetrierten Glase mit Wasser an; die eingegossene Wassermenge ergibt also die Anzahl der Kubikzentimeter des Inhalts. Den freien Raum des Rückenmarkes füllt man vor Ablesung der einzuschüttenden Wassermasse ebenfalls mit Wasser an, andernfalls (d. h. wenn der Rückenmarkskanal vorher eröffnet war) muss man das Foramen occipitale magnum erst mit Kork oder nasser Watte tamponieren. Beim mazerierten Schädel ersetzt Zanke die Dura mater durch eine im Wasser geschmeidig gemachte Schweinsblase von möglichster Grösse und Dünne

Die Wichtigkeit der Differenzzahl zwischen Hirngewicht (letzteres = 1 gesetzt) und Schädelinnenraum wird durch die Tatsache illustriert, dass sich bei Paralytikern Differenzzahlen von 10—580 fanden.

Härtung des Gehirns zum Zweck der Konservierung. (Museumszweck.)

Sei es, dass wir wünschen, normale Gehirne zu Demonstrationszwecken in gehärtetem Zustande aufzubewahren, sei es, dass wir Raritäten dem Museum einverleiben wollen, in jedem Falle erhebt die moderne Technik den Anspruch auf möglichste Erfüllung zweier Bedingungen: Erhaltung von Grösse und Form, sowie Erhaltung der Architektonik, oder mit anderen Worten: das präparierte Gehirn soll sich möglichst wenig vom frischen unterscheiden. Noch bis vor ver-

hältnismässig kurzer Zeit war man weder bemüht noch befähigt, diesen Postulaten Rechnung zu tragen, und die „Spiritussammlungen“ der anatomisch-pathologischen Institute sind dafür Beweis genug. Das rastlose Streben und die Ansprüche der Neurologen gehen aber auf Verbesserungen der makroskopischen Technik nicht minder als der mikroskopischen, und so sind neben der einfachen Härtung in Alkohol resp. in Chrom jetzt eine Reihe von Mitteln verwendet worden, die sich als recht brauchbar eingebürgert haben.

Zunächst aber muss stets und von Anfang an, falls die natürliche Figuration gewahrt bleiben soll, beachtet werden, dass das schwere Gehirn sich ungemein leicht abplattet, wenn man nicht die Vorsicht gebraucht, den Boden des die Flüssigkeit enthaltenen Gefässes reichlich mit weicher Watte zu belegen. Da jedoch auch in diesem Falle nicht jede Abplattung völlig vermieden wird, so ist der Vorschlag von Retzius sehr zu empfehlen, nämlich das frisch herausgenommene und von seinen Häuten noch umgebene Gehirn durch einen Faden an der Arteria basilaris aufgehängt, in der Flüssigkeit schwebend zu erhalten; nimmt man die pia mater bei der Härtung ab, so sinkt das Stirnhirn durch seine Schwere hinab.

Weiterhin gelten hier wie bei den Vorbereitungen zur Färbung zwei Punkte als gleich wichtig: das Material so frisch als möglich zu wählen und ein Multiplum von oft zu erneuernder Flüssigkeit zu verwenden.

Will man nun das Gehirn und Rückenmark nicht zerschneiden, sondern im ganzen zu Demonstrationszwecken aufbewahren, und die Präparate möglichst naturgetreu, der Konfiguration wie Blutfarbe nach, konservieren, so stehen hierzu die fast gleichzeitig angegebenen Methoden von Melnikow-Raswedenkow, von Jores, von Kaiserling, sowie die etwas später erfolgte Modifikation von L. Pick zur Verfügung.

Diese Methoden zerfallen in drei Phasen:

1. Härtung in einem Formalingemisch;
2. Nachbehandlung des Objektes zur Herstellung des ursprünglichen Blutfarbentones;
3. Konservierungsmethode.

Als Härtungsflüssigkeit des frischen Präparates benutzen:

Melnikow-Raswedenkow: reines Formalin (Watte mit Formalin durchtränkt, dessen Dämpfe auf das Präparat 24 St. einwirken).

Jores:	Formalin 5—10,0 Wasser 100,0 Natr. sulf. } aa 2,0 Magnes sulf. } Natr. chlorat. 1,0	ein bis mehrere Tage lang.
Kaiserling:	Formalin 20,0 Wasser 100,0 Kal. acet. 2—3,0 Kal. nitr. 1—1,5	

Für den II. Akt: Herstellung der Blutfarbe, benutzen alle drei Autoren den Alkohol, und zwar kommt nach Melnikow-Raswedenkow das Objekt aus Formalin für 2—3 Tage in 95prozentigen Alkohol, während Jores und Kaiserling 80—95prozentigen Alkohol verwenden und das Präparat nur 24 Stunden darin liegen lassen.

Als endgiltige Konservierungsflüssigkeit verwenden:

Melnikow-Raswedenkow:	Glyzerin 30,0 Kal. acet. 30,0 Aq. dest. 100,0.
Jores	Glyzerin } aa Aq. font. }
Kaiserling	Glyzerin 20,0 Kal. acet. 10,0 Aq. dest. 100,0.

Bei diesen drei Methoden wird zwar die natürliche Blutfarbe, aber nicht der natürliche Blutfarbstoff erhalten, da das Oxyhämoglobin durch Formalin und Alkohol in alkalisches Hämatin umgewandelt wird. Die von L. Pick seit 1898 benutzte Härtungsflüssigkeit hat folgende Zusammensetzung:

Aq. dest.	1000,0
Formalin	50,0
Sal. Karol. fakt.	50,0

Die Präparate kommen frisch und ohne Vorbehandlung in eine reichliche Menge dieser Lösung, am besten von entfetteter Watte umgeben; bei grösseren Objekten werden, nach 24stündigem Aufenthalt in der Lösung, tiefe Einschnitte gemacht, dann das Objekt noch 3 Tage darin gelassen (je nach der Grösse). Nach den ersten 24 Stunden wird die Härtungsflüssigkeit gewechselt und das Präparat umgelagert.

Aus der Flüssigkeit kommen die Präparate in Alkohol (80—85 % 10—12 Stunden (Bildung des alkalischen Hämatins!). Die konservierende Schlusslösung besteht aus:

Aq. dest.	9000,0
Glyzerin	5400,0
Natr. azetik.	2700,0,

wobei das Glyzerin zuletzt zugeführt wird.

Diese Picksche Methode hat auch L. Jacobsohn an ganzen Gehirnen und Rückenmarken, wie auch kleineren Teilen ausprobiert; ich stimme ihm völlig bei, dass so behandelte Präparate sich sehr gut für alle mikroskopischen Untersuchungen eignen, nur etwa mit Ausnahme der Nisslschen Methode, da die Nervenzellen bei der Färbung dann ein verwaschenes Bild zeigten. Weigert-Palsche, van Giesonsche und Marchische Präparate hingegen fallen vorzüglich aus.

Von den älteren Methoden der Konservierung ist am meisten gebräuchlich die

Methode von Giacomini.

1) Das frische Gehirn kommt in eine 10prozentige Chlorzinklösung, in der es öfter umgedreht wird. — Nach 8—10 Stunden zieht man die Pia mater ab.

2) Sobald das Gehirn untergesunken: (nach einigen Tagen) Übertragen desselben in Spiritus, der innerhalb von 12 Tagen 2—3 mal gewechselt wird; der Boden des Gefässes muss mit Watte belegt sein.

3) Das gehärtete Gehirn kommt in Glyzerin, dem event. 1 prozentige Karbolsäure zugesetzt wird; nach völliger Durchtränkung sinkt es unter, wonach man das überflüssige Glyzerin auf eine schiefgestellte Glasplatte abfliessen lässt, damit das Gehirn nun lufttrocken werden kann.

In diesem Zustande kann es viele Jahre frei an der Luft liegen; seine Dauerhaftigkeit ist abhängig von der Dauer der Chlorzinkeinwirkung.

War das Gehirn nicht mehr ganz frisch, so wird empfohlen, durch die Karotiden etwa 600 Gramm der Chlorzinklösung unter mittlerem Druck zu injizieren. Sollte das Gehirn später Tendenz zum Schrumpfen zeigen, so kann man es wiederum mit Erfolg in Glyzerin übertragen. Statt Chlorzink kann man auch 5 prozentige Karbolsäurelösung anwenden, säuert aber dann Spiritus und Glyzerin leicht mit Essigsäure an.

Will man Spiritus-Gehirne verwenden, so fällt die Behandlung No. 2 weg.

Der grosse Vorzug der Giacominischen Methode besteht darin, dass das Gehirn so gut wie garnicht schrumpft, und dass es bei gewisser Festigkeit immer noch eine gewisse Weiche besitzt, welche sogar ein Eindringen in die Furchen ermöglicht, so dass auch zum Studium die Methode sehr geeignet ist. Die Pia mater lässt sich nach Bischoff, dem ersten, welcher das Chlorzink für Gehirne anwendete, leicht, glatt und rein abziehen.

Eine Modifikation hiervon ist die

Methode von Stieda.

1) Einbringen des Gehirns in gesättigte Chlorzinklösung (24 Stunden).

2) Abziehen der Pia. Alkohol (96 %), alle 5 Tage zu wechseln.

3) Nach genügender Härtung (ca. 2—3 Wochen) Übertragen in Terpentin (2—4 Wochen), welches um so besser eindringt, je mehr entwässert wurde. Hier wird das Gehirn wieder etwas weicher, aber „transparent“ und von bräunlicher Farbe.

4) Übertragen in Ölfirnis auf 2 Wochen; danach an der Luft trocknen lassen auf Fliesspapier (1 Woche).

Diese Methode ergibt ausser einer käsigen Beschaffenheit des Gehirns auch eine grössere Schrumpfung um ein Viertel und mehr des ursprünglichen Volumens. Bessere Resultate scheinen sich durch längeres Verweilen im Terpentin und kürzeres Verweilen im Ölfirnis zu ergeben.

Sehr gut und auch wegen ihrer Einfachheit empfehlenswert ist die

Methode von Laskowski.

Das frische Gehirn wird auf 15—20 Tage in folgende Flüssigkeit gebracht:

Formalin. officin. 2,0.
Glycerini pur. 100,0.

die Meningen sind vorher abzuziehen.

Nach Ablauf der 15—20 Tage kann man das Gehirn an der freien Luft bereits aufbewahren. anderenfalls in der gleichen Flüssigkeit.

Ursprünglich benutzte Laskowski Karbolsäure statt des Formols und zwar 5,0 : 100,0 Glyzerin resp. eine Flüssigkeit von Glyzerin 100,0; Alkohol (95 %) 20,0, Karbolsäure 5,0, Borsäure (krystallisiert) 5,0.

Alle diese Methoden haben den Vorteil, dass die nach ihnen gehärteten Organe an der freien Luft gehalten werden können.

Methode von Lenhossék.

Das Gehirn wird in Alkohol, Zink oder Müllerscher Flüssigkeit gehärtet: zuletzt wird es jedenfalls in Alkohol übertragen, wobei man die Sulci zum Zweck des leichteren Eindringens der Flüssigkeit mit Watte offen hält.

Nach Verdunsten des Alkohols von der Oberfläche bestreicht man das Organ in den Sulci und an den Gyri mit einer mässig dünnen Celloidinlösung. Sobald diese getrocknet ist, hebt man das Gehirn in Alkohol auf. Zum Zwecke von Demonstrationen darf das Organ dann bis 2 Stunden der Luft ausgesetzt werden.

Retzius bemerkt [1]), dass für das fötale Gehirn eine Chrom-Essigsäuremischung mit etwas Überosmiumsäure (also eine modifizierte Flemmingsche Lösung) geeignet zu verwenden ist, und zwar zeigt sich das fötale Gehirn bald nach der Injektion in die Nabelvene oder Aorta erstarrt. (Alkohol und Chlorzink sind für das fötale Hirn ungeeignet.) Für Embryonen der ersten Monate ist eine 3 bis 4 Prozent. Kaliumbichromatlösung jedoch noch vorteilhafter.

Für das Gehirn des Erwachsenen empfiehlt Retzius neben dem Kalium bichromicum ebenfalls das modernste Mittel, das Formol, trotzdem hin und wieder gewisse Auflockerungen der Oberfläche zu bemerken sind. Am ausgezeichnetsten dünkt ihm jedoch die Kombination:

Kal. bichromic.	3—4,0.
Formol	1,0.
Aq. dest.	100,0;

bei deren Anwendung das Gehirn nicht so dunkel wird wie bei der reinen Chromlösung, die Härtung nur 2—3 Wochen dauert, und vor allem die Architektonik der Höhlenwände (im Gegensatz zum Ergebnis bei einfacher Formolhärtung) gut erhalten bleibt.

Andere, meist wenig empfehlenswerte Methoden sind noch von Flesch (Glyzerin), Schwalbe (Paraffin), Broca (Salpetersäure), Rosenbach (Karbolsäure) angegeben worden, erscheinen aber völlig entbehrlich gegenüber obigen.

Auf die härtende und sonstige Wirkung des Alkohols und der Chromsäure wird weiter unten eingegangen werden.

[1]) Retzius. Das Menschenhirn 1896. Einleitung.

Plastische Reproduktion pathologisch-anatomischer Präparate

(nach P. Berliner und L. Jacobsohn).

Die Herstellung geschieht nach Berliner in der Weise, dass man zunächst von dem Obduktionsteil, also hier vom Gehirn, einen Gypsabguss (die Negativform) anfertigt. Wenn man alsdann diese Form mit Wachs, das durch Erhitzen im Wasserbade verflüssigt ist, ausgiesst, erhält man das Positiv, das Modell, welches nunmehr naturgetreu mit Ölfarben bemalt wird, indem das Original als Vorlage dient. Durch späteres Auftragen verschiedener Lackarten bezw. durch Zusatz diverser Lösungsmittel zu den Ölfarben erhält man den mehr oder weniger feuchten Glanz, von dessen richtiger Wiedergabe auch viel abhängt, ob das Modell lebenswahr erscheint oder nicht.

Jacobsohns Gipsmodelle bringen die Flächenverhältnisse sämtlicher Furchen der Hirnhemisphäre zur Anschauung. Die Pia mater wird abgezogen, die Wände sämtlicher Furchen dann so auseinandergezogen, dass der Grund derselben deutlich sichtbar wird; in jede Furche wird dann flüssiges Paraffin (50—60 °) mittels einer Pipette eingeträufelt, welches nach Erstarrung einen getreuen Abdruck der Furchen bewirkt. Nachdem so alle Furchen der Hemisphärenfläche abgedrückt sind, wird über die Fläche flüssiger Krönigscher Lack gegossen, der erstarrt einen festen Mantel bildet. Aus diesem Negativ lässt sich die frische Hemisphäre leicht entfernen. Das Positiv wird hergestellt mittels kalt angerührten Gipsbrei, mit dem man das Negativ ausfüllt. Ist der Gips erstarrt, so bringt man das ganze in heisses Wasser, in dem sich Paraffin und Lack lösen.

Literatur.

Burkhardt, Microtomie des frischen Hirns. Zentralbl. f. d. med. Wissenschaften 1881.

Byron-Bramwell, On a ready method of preparing large sections of the brain. Brain. Vol. X. 1887/8.

Déjerine, Anatomie des centres nerveux. Paris 1895.

Flatau, E. Ustrój Nerwowy w świetle najnowczych badań. 1899. Warschau. (Polnisch.)

Jacobsohn, Sektion des Nervensystems. Handb. der Pathol. Anat. des Nervensystems. 1904. Berlin. S. Karger.

„ Demonstration eines Gipsmodells der menschlichen Grosshirnhemisphäre. Neurolog. Zentralbl. No. 3. p. 139. 1903.

Jores, L. Die Konservierung anatomischer Präparate in Blutfarbe mittels Formalin. Zentralbl. f. Pathol. u. pathol. Anatomie. 1896. p. 134.

Kaiserling, C. Über die Konservierung von Sammlungspräparaten mit Erhaltung der natürl. Farben. Berl. klin. Wochenschr. 1896. p. 775.

„ Weitere Mitteilungen über die Herstellung möglichst naturgetreuer Sammlungspräparate. Virchows Archiv f. pathol. Anat. Bd. 147. p. 389.

Laskowski, L'enbaumement. La conservation des sujets et les préparations anatomiques. Genève 1896.

Melnikow-Raswedenkow. Eine neue Konservierungsmethode. Zieglers Beitr. z. pathol. Anat. Bd. 21.

„ Über die Herstellung anatomischer Präparate nach der Formalin-Alkohol- Glyzerinessigsauren Salzmethode. Zentralbl. f. Pathol. u. pathol. Anat. 1897 p. 121.

Meynert. Das Gesamtgewicht und die Teilgewichte des Hirns in ihren Beziehungen zum Geschlechte, dem Lebensalter und dem Irrsinn, untersucht nach einer neuen Wägungsmethode. Vierteljahrsschr. f. Psych. 1867.

Mies. Über das Hirngewicht des heranwachsenden Menschen. Korrespondenzblatt der deutschen Gesellsch. f. Anthrop. 1894.

Nauwerck. Sektionstechnik 1899. Fischer, Jena. III. Aufl.

Nothnagel. Topische Diagnostik der Gehirnkrankheiten. Berlin 1879.

Obersteiner. Anleitung beim Studium des Baues der nervösen Zentralorgane im gesunden und kranken Zustande. IV. Aufl. 1901. Wien, Deuticke.

„ Ein schweres Gehirn. Zentralbl. f. Nervenheilk. 1890.

Pfister. Anthropologie des Rückenmarks. Neurolog. Zentralbl. 1903. No. 16/17.

„ Über das Gewicht des Gehirns und einzelner Hirnteile beim Säugling u. älterem Kinde. Ebenda No. 12.

„ Das Hirngewicht im Kindesalter. Arch. f. Kinderheilk. XXIII.

Pick, L. Über die Methoden, anatomische Präparate naturgetreu zu konservieren. Berl. klin. Wochenschr. 1900, No. 41.

Pictres. Recherches sur les lésions du centre ovale des hémisphères cérébraux étudiées au point de vue des localisations cérébrales. Thèse de Paris. 1877.

Retzius. Das Menschenhirn. 1896.

Siemerling. Die zweckmässigste Art der Hirnsektion. Allgem. Zeitschr. f. Psych. u. psych. gerichtl. Medezin. Bd. 50 p. 349.

Siemerling u. Edinger. Gehirnsektion. Zeitschr. f. Psych. 1894 p. 349 ff.

Strasser. Anleitung zur Gehirnpräparation. 1901. Fischer, Jena.

Thurnam. On the weight of the brain. Journ. of ment. science 1866.

Virchow. Die Sektionstechnik im Leichenhause des Charitékrankenhauses mit besonderer Rücksicht auf die gerichtsärztliche Praxis. III. Aufl. Berlin 1884.

v. Walsem. Über das Gewicht des schwersten bis jetzt beschriebenen Gehirns. Neurolog. Zentralbl. 1899. No. 13.

Zanke. Messung des Schädelinnenraums. Neurolog. Zentralbl. 1897. p. 488. ff.

„ Hirngewicht und Schädelinnenraum. Neurol. Zentralbl. 1897. p. 881. ff.

Ziehen. Nervensystem 1899. Handbuch der Anatomie von K. v. Bardeleben.

II. Härtungs- resp. Fixierungsflüssigkeiten für das zentrale und peripherische Nervensystem.

Die Zahl dieser Härtungsmittel ist für unsere Zwecke gegenüber den in der Gesamthistologie angewendeten eine verhältnismässig kleine, und beschränkt sich, abgesehen von wenigen speziellen Methoden (Nissl, Golgi) eigentlich auf das Chrom (Müllersche resp. Erlitzkische Flüssigkeit) und das Formol (Blum): letzteres hat seit ca. 10 Jahren eine so ungemeine Anwendung vermöge vielfacher Vorzüge erfahren, dass es geradezu als das Härtungsmittel der Gegenwart κατ' ἐξοχήν erscheint und deshalb an erster Stelle erwähnt werden mag.

Als oberste Regel aber mag gelten, dass Gehirn, Rückenmark und Nerven sofort nach der Herausnahme aus dem Körper, ohne mit Wasser in Berührung gebracht zu werden, in die Fixierungs- resp. Härtungsflüssigkeiten kommen; das Misslingen guter Färbungsresultate, besonders bei den subtilen Methoden, ist oft durch Vernachlässigung dieser Regel bedingt.

Die erste Anwendung von Härtungsflüssigkeiten, in der Absicht, später feine Schnitte aus dem Rückenmark anzufertigen, stammt von Keuffel (1810)[1], welcher Sublimatlösungen und verdünnte Salpetersäure bereits benutzte. Die härtende Eigenschaft der Chromsäure entdeckte L. Jacobsohn in den dreissiger Jahren, während Hannover sie erst für histologische Zwecke verwendete. Heinrich Müller in Würzburg wandte jedoch als erster das chromsaure Kali an, ohne dass (nach Weigert, a. a. O.) in seinen gedruckten Arbeiten die Formel seiner klassischen Flüssigkeit, der Müllerschen Flüssigkeit sich findet; die Chromsäure selbst ist durch dieses Salz verdrängt worden, da sie schwer eindringt und die Organe leicht brüchig macht.

Das **Formol**[2]) ist die 40 prozentige wässerige Lösung des **Formaldehyd** (eines Gases von der Formel HCOH). Anfangs als Desinfektionsmittel angegeben, wurde es von Blum (Vater) für makroskopische, von Blum (Sohn) für mikroskopische Zwecke verwendet.

---

[1]) Weigert: Technik. Merkel-Bonnet 1895, Bd. V.

[2]) Formol Höchster Farbwerke = Formalin Schering-Berlin.

Die Flüssigkeit ist hell, von charakteristischem, penetrantem Geruch, ihre Reaktion neutral oder schwach sauer.

Für das Nervensystem kommen fast nur 10prozentige Lösungen des käuflichen Formols in Anwendung; nach Gerota haben 20—50-prozentige Lösungen eine zerstörende nekrotisierende Wirkung auf die Zellen aller Organe mit Ausnahme des Nervensystems.

Im Gegensatz zum Alkohol wirkt das Formol nicht wasserentziehend; die Organteile werden rapide in ihrer Form fixiert und erhalten eine elastische Härte wie etwa Kautschuk.

Das Gewicht des Gehirns und Rückenmarks nimmt in 10prozentiger Lösung etwas zu[1]), die Farbe wird weniger als durch ein anderes Fixativ alteriert, die Stücke selbst werden schneller als durch Alkohol, Sublimat etc. durchtränkt.

Einer der grössten Vorteile aber besteht darin, dass nach Formolhärtung nunmehr jegliche bedeutsamere Nervenfärbung ermöglicht ist, sowohl die Nissl'sche, wie die Golgi'sche, die Markscheiden- und Neurogliafärbung Weigerts, die Marchische und die Fibrillenmethoden Bielschowskys und Cajals, — ein Vorzug, der vielleicht neben der schnelleren Härtung am meisten den „Siegeslauf" dieses Mittels berechtigt erscheinen lässt.

Ausser der wässerigen 4—10prozentigen Lösung kann man unter Umständen auch eine 2—4prozentige Lösung in Alkohol (85 %) verwenden; des ferneren wird eine Kombination des Formols mit Müllerscher Flüssigkeit (Orth) resp. reiner doppelchromsauren Kali-Lösung gebraucht.

Die sogenannte Orthsche Mischung (Formol-Müller: F. M.) besteht aus:

Kal. bichrom.	2,5
Natr. sulf.	1,0
Formol pur.	10,0
Aq. dest.	100,0.

Am 4. Tage zeigt sich ein krystallinischer Niederschlag, mit dessen Auftreten die Mischung ihre besondere Wirksamkeit verloren hat, daher ist die Flüssigkeit jedesmal frisch zuzubereiten und eventl. bald zu wechseln, falls ihre Wirkung noch nicht ausgereicht haben sollte.

Orth gibt an, dass kleinere Organstücke (0,5 cm) bereits nach 3 Stunden im Brutofen auf diese Weise fixiert sind; die Schnittkonsistenz ist eine ausgezeichnete, die Färbungen gelingen um so besser, je mehr ausgewässert ist (am besten Carminfärbungen).

---

[1]) Vgl. Kap. III.

Von den zahlreichen Kombinationen und Variationen, welche sich das Formol hat gefallen lassen müssen, sei noch die von A. Marina publizierte erwähnt, welche darauf berechnet ist, an den gleichen Stücken des Zentralnervensystems sowohl Weigertsche wie Nisslsche Färbung zu gestatten; auch die Heldsche Methode und die von van Gieson gelang dem Autor.

Nach Marina taucht man das ganze Gehirn oder Teile desselben in die Flüssigkeit, welche aus Alkohol (90 %) 100 ccm, Formol 5 ccm, Chromsäure 0,1 ccm besteht; am folgenden Tage, nach Zerlegung der Präparate, gibt man dieselben in eine frisch bereitete Portion derselben Flüssigkeit, welche jeden Tag bis drei, höchstens 5 Tage hindurch erneuert wird, dann klebt man die Stücke direkt auf Holz oder Kork und bewahrt sie in 90 proz. Alkohol oder in einer 1 prozentigen alkoholischen (90 %) Chromsäurelösung. Bei dem Schneiden befeuchtet man das Messer mit Alkohol von 90 Prozent.

Die Schnitte, welche nach Nissl oder mit Thionin gefärbt werden sollen, werden in 96 proz. Alkohol, die für die Neurogliafärbung in der Chromogenlösung, die anderen in einer 3 proz. Kalibichromatlösung (ohne oder mit 2—3 Tropfen Ammoniak) aufbewahrt.

Die alkoholische Chromsäurelösung hält man bereit, das Formol wird aber erst zum Gebrauch hinzugesetzt.

Die **Müller**sche Flüssigkeit[1]) besteht aus:

Kal. bichrom.	2,5
Natr. sulfur.	1,0
Aq. dest.	100,0.

In der neueren Zeit ersetzt man die ursprüngliche Müllersche Flüssigkeit gern durch eine reine Lösung von doppeltchromsaurem Kalium (heissgelöst) und zwar am besten in 4—5 prozentiger Stärke; Schimmelbildung, welche übrigens kein Zeichen für Verdorbensein von Präparaten ist, wird (wenn auch nicht absolut sicher) durch geringen Zusatz von Kampher oder Karbolsäure verhütet.

Ferner empfiehlt **Weigert** als schnellen Prozess die Fixierung in Formol (4 Tage), danach 4 tägige Beizung in:

Kal. bichrom.	5,0
Fluorchrom	2,0
Aq. dest.	100,0.

Diese braune Chrombeize ist leicht löslich und ein guter Ersatz für die Müllersche Flüssigkeit.

Die **Erlitzki**sche Flüssigkeit besteht aus:

Kal. bichrom.	2,5
Cupr. sulfur.	0,5
Aq. dest.	100,0.

[1]) Angegeben von Heinrich Müller in Würzburg (1859?).

Diese von Weigert ihrer Vergessenheit entrissene Flüssigkeit unterscheidet sich also von der Müllerschen nur in dem Ersatz des schwefelsauren Natrons durch die halbe Quantität schwefelsauren Kupfers. Der Vorteil, den sie bietet, ist die schnelle Härtung, welche im Brutofen in ca. 5 Tagen, bei Zimmertemperatur in ca. 10 Tagen vollendet ist; aus dieser Eigenschaft resultiert aber logisch auch der ihr anhaftende Nachteil einer zu starken Schrumpfung.

Am besten stellt man sich die nötige Quantität jedesmal frisch her und ersetzt sie bei der Anwendung jeden zweiten Tag von neuem. Die gehärteten Stücke werden nacheinander in Alkohol steigender Konzentration (70 %, 80 %, 90 %) für je 24 Stunden gebracht.

Die Niederschläge, welche sich oft in den Schnitten zeigen, können meist durch Auswaschen in warmem Wasser, oder durch leicht mit Salzsäure angesäuertes Wasser oder endlich durch Nachbehandlung mit 0,5 prozentiger Chromsäurelösung (vor Einbringen in den Alkohol) wenigstens partiell entfernt worden.

Der **Alkohol** ist, wie schon bemerkt, für das Zentralnervensystem als Fixierungs- resp. Härtungsmittel im allgemeinen nicht anzuwenden, mit Ausnahme der Nisslschen Nervenzellenfärbung oder der Darstellung der Zellstruktur mit Thionin nach von Lenhossék, sowie der Fibillenfärbung nach Cajal; selbstverständlich kommt er zur Nachbehandlung, nachdem die Stücke in irgendwelcher Fixationsflüssigkeit gehärtet wurden, in Anwendung; in den Fällen, wo ganze Stücke in Karmin z. B. gefärbt wurden, erst nach der Durchfärbung.

Aus Müllerscher Flüssigkeit werden die Stücke direkt ohne Auswaschen in Alkohol nachgehärtet.

Zu den Nachteilen, die ihm anhaften, gehört die stärkere Schrumpfung, welcher die Stücke unterliegen, und die grösseren Kosten gegenüber der Härtung in Kal. bichrom.

Im allgemeinen kommt der Alkohol als absoluter (99,8 prozentiger) oder 96 prozentiger zur Verwendung, so wie man ihn überall käuflich erhält. Aus 96 prozentigem ist es leicht, durch Ausziehen des Wassers mittels weissgebrannten Kupfersulfats absoluten herzustellen, wie man aus ihm umgekehrt durch Beimengen von Aqua niedrigerprozentigen Alkohol bereiten wird; wenn es nun wohl wenig darauf ankommt, statt Alkohol von 60 Proc. z. B. solchen von etwas geringerem oder höherem Prozentgehalt zu verwenden, so sei hier doch der Formel von Stöhr gedacht, nach welcher in solchen Fällen zu verfahren ist. Stellt p. den gewünschten Prozentgehalt dar, so ist

$$100 : 96 = x : p.,$$

bei Bedarf von 90 proz. Alkohol also

$$100 : 96 = x : 90$$
$$96\,x = 90 \,.\, 100$$
$$x = \frac{9000}{96} = 93{,}7, \text{ rund } 94,$$

d. h. um 100 ccm 90 proz. Alkohol zu erhalten, muss man 94 ccm 96 proz. Alkohols mit 6 ccm Aqua mengen.

Mercier hat in seiner Technik eine ganze Tabelle für verschiedenprozentigen Alkohol ausgerechnet, doch ist deren Anführung wohl hier nicht geboten.

Auch die Härtung in **Sublimat** kommt nicht allzuhäufig in Betracht. Verwendet wird meist eine Lösung von

Sublimat (krystall.)	7,5
Physiolog. Kochsalzlösung	100,0,

welche aufgekocht wird; die Stücke verweilen darin 4—24 Stunden im Dunkeln, werden gründlich ausgewaschen und in Alkohol steigender Konzentration nachgehärtet.

Die Niederschläge, welche sich so zahlreich bilden, sind zum Teil durch Auswässerung zu beheben; Bolles-Lee empfahl hierfür die Anwendung Lugolscher Lösung (Jod 4,0, Jodkalium 6,0, Wasser 100,0). Doch sind die Färbungsresultate nicht immer völlig befriedigende, die Tinktionen mit Hämatoxylin, Karmin etc. sind zu diffus. Für die Darstellung der Zellen speziell ist eine Überfärbung mittels einer der Anilinfarben und folgende Differenzierung in Alkohol empfohlen worden (Goodall wandte besonders Toluidinblau an).

Zenkersche Lösung.

Sublimat.	5,0
Kal. bichrom.	2,5
Natr. sulf.	1,0
Aq. dest.	100,0
Acid. acet. glac.	5,0

Im wesentlichen besteht also die Mischung aus Müllerscher Flüssigkeit und Sublimat; der Eisessig wird erst kurz vor dem Gebrauch hinzugefügt.

Nach dem Fixieren (14 Tage ca.) auswaschen in Wasser, härten in mehrfach zu wechselndem Jodalkohol (70 Proz. Alkohol + Jodtinktur, so dass Portweinfarbe entsteht), wobei das Sublimat ausgezogen wird; das Jod wiederum wird alsdann in 80 proz. Alkohol aus den Organteilchen entfernt.

Die Wirkung der Essigsäure beruht bei der Sublimatanwendung in der Verhinderung von Schrumpfung und Brüchigwerden; der Nachteil des Sublimats: mit den Albuminaten unlösliche Verbindungen einzugehen und so Krystallisation im Inneren des Organsstückchens zu bewirken, kann durch den Jodalkohol mehr oder minder eliminiert werden.

Flemmings Chromosmiumessigsäure:

Osmiumsäurelösung (2 prozentig)	4,0
Wässerige Chromsäurelösung (1 prozentig)	15,0
Eisessig	1,0.

Die Stücke bleiben 1—3 Tage hierin, werden im fliessenden Wasser 24 Stunden ausgewaschen und in Alkohol steigender Konzentration nachgehärtet.

Man gebraucht Flemmings Lösung besonders für die Darstellung von Kernteilungen (Nachfärbung: Safranin).

Empfehlenswert erscheint **Friedmanns Modifikation:**

Osmiumsäurelösung (1 prozentig)	0,5
Chromsäurelösung (1 prozentig)	7,0
Eisessig	0,3.

Die Grundsubstanz der Präparate erscheint hier etwas weniger dunkel; die Stücke bleiben bis 24 Stunden in der Lösung, werden ausgewaschen und in Alkohol steigender Konzentration gehärtet; die Färbung ist angeblich besser, wenn das Stück erst einige Zeit in Alkohol verweilt.

Folsche Modifikation der **Flemming**schen **Lösung:**

Osmiumsäure (1 prozentig)	2,0
Chromsäure (1 prozentig)	25,0
Essigsäure (2 prozentig)	8,0
Wasser	68,0.

Diese Mischung ist speziell für die Fälle empfohlen worden, wo man Teile, welche vom lebenden oder überlebenden Nervensystem gewonnen wurden, in ihrer feinsten Struktur erkennen will.

Die Lösung muss bei Auftreten einer Trübung erneuert werden. Nach 24 Stunden ist das Präparat meistens gehärtet und wird nach gutem Auswaschen in 80 prozentigen Alkohol gebracht.

Osmiumsäure (richtiger: Überosmiumsäure) (von Max Schultze eingeführt).[1]) Man wendet dieselbe in 1 prozentiger Lösung an und lässt sie im Dunkeln auf die zu härtenden Stückchen einwirken; letztere

[1]) Der Preis der Osmiumsäure ist in den letzten Jahren enorm gestiegen und beträgt jetzt ca. 8—9 Mk. pro Gramm!

mögen hier wegen der Eigenschaft der Osmiumsäure, sehr schwer einzudringen, besonders klein gewählt werden; die Präparate werden nach 1—5 tägigem Verweilen in der Säure ausgewaschen und in Alkohol übertragen.

Angewendet wird die Osmiumsäure schon wegen ihres Preises wenig zur Härtung ausser für die alte Exnersche Methode der Markscheidenfärbung; im übrigen wird sie hauptsächlich bei der Marchischen und Golgi-Cajalschen Methode verwertet, ist jedoch selbst bei letzterer nicht mehr von der ihr anfangs zugeschriebenen Bedeutung. Ihre Wirkung auf die Markscheide beruht in einer Reduktion der Überosmiumsäure zu metallischem Osmium. — Bemerkt sei, dass Fetttröpfchen sich intensiv schwarz in Osmiumsäure färben. Ranvier hat zuerst die Dämpfe der Osmiumsäure statt letzterer selbst benutzt, ein Verfahren, das z. B. für die Retina sehr empfehlenswert erscheint.

Rabls Flüssigkeit:

Chromsäurelösung (0,3 prozentig) . . . 200,0
Konzentrierte Ameisensäure . . . . 4—5 gtt.

Die Stücke verweilen hierin 12—24 Stunden, werden ausgewaschen und in Alkohol steigender Konzentration nachgehärtet.

Merkels Flüssigkeit:

Chromsäurelösung }
Platinchloridlösung } 1,0 : 400,0 aa.

Die Stücke verweilen darin 4—6 Tage und werden direkt in Alkohol steigender Konzentration nachgehärtet.

Bendas Flüssigkeit:

A) Salpetersäure 10,0
Aq. dest. . . . . 90,0.
B) Kal. bichromic. Lösung . . . . 1 Teil
Aq. dest. . . . . 2 Teile.

Die Stückchen verweilen 24 Stunden in Lösung A und werden ohne Auswaschen direkt in Lösung B übertragen, welche allmählich konzentrierter gemacht wird, bis zum Verhältnis von 1 : 1. Nach ca. 14 Tagen auswaschen, nachhärten in Alkohol steigender Konzentration. Nicht geeignet ist diese Härtung für embryonales Gewebe.

Salpetersäure: Die Stücke verweilen in 10prozentiger Lösung 1—3 Stunden, auswaschen, Alkohol. —

Sehr gut zu verwenden ist endlich noch **Carnoys Gemisch:** (Carnoy-Gehuchten).

Chloroform. 10,0
Acid. acet. 30,0
Alcoh. absol. . . . . . . 60,0.

Der Vorzug dieser Lösung liegt in ihrer ausserordentlich schnell und gleichmässig wirkenden Härtung. Ohlmacher empfahl, die Prozentverhältnisse 5 : 15 : 80 zu nehmen, und noch Sublimat 20,0 hinzuzusetzen; kleine Stückchen werden in ca. 20 Minuten, Menschenhirne in ca. 24 Stunden fixiert. Nissls Nervenzellenfärbung z. B. gelingt an so gehärtetem Material leicht.

Für jedes Material, das wir zum Zwecke der Herstellung von gefärbten Präparaten verwenden, gilt als oberste Regel, dass es so frisch als möglich genommen werde. Nun sind ja praktisch in dieser Hinsicht bei dem menschlichen Zentralnervensystem stets gewisse Grenzen gezogen, und wenn wir vom Tierexperiment absehen — von dessen Ergebnissen doch meist nur beschränkte Rückschlüsse auf den Menschen gezogen werden können — so haben wir es dann meist mit Nervensubstanz zu tun, die immerhin schon gewissen Veränderungen im Verlaufe einer Reihe von Stunden nach dem Eintritt des Todes unterlegen ist. Insofern es sich nun um alte und chronisch degenerative resp. abgelaufene Prozesse, wie bei Tabes, Syringomyelie z. B. handelt, kommt diese Differenz von Stunden kaum in Betracht. Von grösster Bedeutung aber muss die mangelnde Frische des Materials dann werden, wenn wir, wie mit der Nisslschen Methode und den neuen Fibrillenmethoden, feinere Vorgänge in den Zellen und Fasern studieren wollen.

Freilich dürfen wir nie vergessen, dass man eigentlich nur zu oft nicht sagen kann, bei der oder jener Krankheit ist der pathologische Vorgang auch in Wahrheit der oder jener. Wir müssen uns stets dessen bewusst sein, und dürfen eigentlich nicht anders sagen — ausser eben bei den abgelaufenen, unveränderlichen Prozessen — dass so und so viel Stunden nach dem Tode uns die Färbung einen entsprechenden Befund bietet, ohne dass wir stets daraus den Schluss ziehen dürfen, dass im noch lebenden Organ die Verhältnisse die gleichen sind.

Nissls Methode, welche das frischeste Material verlangt, hat uns seiner Zeit den ersten Ausblick eröffnet, feinere pathologische Vorgänge dereinst zu verstehen.

In jedem Falle also — selbst bei Anwendung der Marchischen Methode zum Zwecke experimenteller Untersuchungen — bringe man das Zentralnervensystem oder seine Teile so früh und frisch als möglich in die Fixierungs- resp. Härtungsflüssigkeiten. Jedes Abwaschen mittels Wasser werde streng vermieden.

Die Flüssigkeiten müssen allzeit ein Multiplum der Organmenge betragen und besonders in der ersten Zeit mehrfach gewechselt werden. Auf dem Boden der Gefässe möge eine Schicht Watte oder Glaswolle liegen. — Die moderne Technik mit ihren auf stete Verfeinerungen der Methoden gerichteten Bestrebungen verlangt meist in Rücksicht auf die spätere Färbung, dass die Organteilchen so minimal wie nur irgend möglich geschnitten werden zum Zwecke des schnelleren, vollkommeneren und gleichmässigeren Eindringens der Flüssigkeiten. Bei grösseren Stücken, deren Zusammenhang nicht ganz verloren gehen soll, behelfe man sich wenigstens mit Einschnitten, die im Laufe der ersten Tage in allmählich wachsender Zahl in das Organ gemacht werden; damit diese Einschnitte nicht von illusorischer Funktion bleiben, möge die Trennung durch geringe Mengen von Watte aufrecht erhalten werden.

Eine wesentliche Beschleunigung der fixierenden und härtenden Wirkung der Fluida wird durch die Wärme erzielt (ebenso wie bei der späteren Färbung), welche jedoch nicht über 30 Grad C. steigen darf.

Eine Hirnhemisphäre erlangt nach etwa 3 Monaten, die Medulla spinalis nach etwa 6 Wochen in Müllerscher Flüssigkeit, resp. in 2—5 prozentiger Lösung von Kalium bichromicum die genügende Härte bei Zimmertemperatur; bei 30 Grad C. in etwa dem vierten Teil dieser Zeit. Auf Weigerts oben erwähnte »Braune Chrombeize«, sowie auf die Abkürzungen, welche Weigert für seine Markscheidenfärbung bis auf 4—5 Tage gelungen ist, sei auch an dieser Stelle verwiesen (siehe Abschnitt Markscheidenfärbung).

Nach beendeter Härtung in Kalium bichromicum oder Formol mit Chrom mögen die Stücke ohne Auswässerung in den Alkohol übertragen werden. Um die Bildung von Chromniederschlägen zu verhindern, ist nach H. Virchow der Abschluss von Licht nötig.

Diejenigen Stücke allein, an denen man Karminfärbung ausschliesslich vornehmen will, dürfen nach der Härtung im Wasser verweilen, da an Alkoholpräparaten keine gute Karminfärbung erzielt wird; hier bereits sei daher auf die Durchfärbung in toto mittels eines der geeigneten Karminpräparate (speziell des karminsauren Natrons) verwiesen.

Für die meisten Färbungen sei auch noch eines Verfahrens gedacht, welches, so geringfügig es ist, doch grösste Beachtung und Verwendung verdient: es ist das Verfahren der »doppelten Methode«, wie sie Ramón y Cajal zuerst für die Golgische Färbung empfahl, und wie man sie mit grösstem Vorteil jetzt auch bei den anderen klassischen Methoden: Weigerts Markscheiden- und Neuroglia-

färbung, Nissls Nervenzellfärbung anwenden kann; man verdopple (oder verdreifache) das Verfahren der Färbung und Differenzierung bis zur Erzielung guter Resultate; die geringe Mühe lohnt sich reichlich.

Die Untersuchung ungefärbten frischen Materials.

Nur in wenigen Fällen wird das Nervensystem noch mikroskopisch betrachtet, ohne dass eine Härtung und Färbung stattgefunden hat; denn das, was die modernen Neuropathologen zu sehen wünschen, stellt sich bei dem einfachen Zerzupfungspräparat und nach Anwendung von Mazerations- und Isolationsmethoden doch nur zu mangelhaft resp. gar nicht dar.

Für diese wenigen Fälle jedoch, in denen man von der Färbung absieht oder die primitiveren Untersuchungen kultivieren will, kommt zunächst das Verfahren des Zerzupfens in Betracht. Man exzidiert mit Schere und Pinzette ein kleines Stückchen und zerzupft mit Präpariernadeln dasselbe auf dem Objektträger und zwar in physiologischer Kochsalzlösung. Sind die Schwierigkeiten, das Objekt in seine kleinsten Teilchen zu zerlegen, zu gross, so führt die Anwendung der sogen. Mazerationsflüssigkeiten (Isolationsflüssigkeiten) nach 24 Stunden zum Ziele; doch darf hier nur wenig Flüssigkeit verwendet werden.

Erwähnt seien als viel verwendete Mittel folgende:

1) 33 prozent. Alkohol (Ranviers Drittelalkohol),
2) dünne Chromsäurelösungen (0,01—0,03 %),
3) Müllersche Flüssigkeit,
4) 0,1 prozent. Osmiumsäure.

Um die Präparate durchsichtiger zu machen und manche Elemente deutlicher zu gestalten, dienen folgende Reagentien:

1) Glyzerin, am besten halb mit Wasser verdünnt (auch für gehärtetes Material anzuwenden),
2) Kalium aceticum, in gesättigter, wässeriger Lösung (50 %),
3) Essigsäure, in 1 2 prozent. Lösung.

Frische Präparate können auch gefärbt werden, indem man vom Rande her einen Tropfen Farblösung (Methylenblau, Methylgrün etc.) zufliessen lässt. Hämatoxylin ist jedoch hierzu nicht geeignet.

Die Markierung der Stücke.

Es ist unbedingt nötig, auch wenn man noch so viele Gefässe zur Verfügung hat, jedes Stück, bevor man es in die erste Flüssigkeit bringt, genau zu markieren. Dies kann einfach dadurch geschehen, dass man mittels feinster eingesteckter Borsten (oder mit Tinte) nach eigener Wahl die Ober- oder Unterseite rechts und links des betr. Stückes markiert, und ferner bei gemeinsamer Behandlung mehrerer Stücke einen Faden durch einen Winkel des Stückes hindurchzieht, an welchem ein kleiner Karton mit entsprechendem Vermerke hängt.

Beim Rückenmark speziell möge man nie versäumen, das betr. Segment genau von vornherein zu bestimmen.[1]) Rindenstückchen kann man mit der Nummer versehen, welche die betr. Partie in Exners Tafeln führt, die mit numerierten Quadraten bedeckt sind.

Die Stücke kommen mit den Markzeichen in die Härtungsflüssigkeit, Alkohol, Zelloidin etc., und bei dem späteren Aufkleben auf Kork mag auch der Zettel mit angeklebt werden.

Zur Bezeichnung der Holz- oder Korkblöcke, welche die Präparate tragen, ist der sogenannte Negropenzil No. 1 oder Nr. 2 ausserordentlich zu empfehlen. Die mit demselben erzeugte Schrift ist ganz schwarz und daher deutlich; im Alkohol zwar dauerhaft, ist sie andererseits durch scharfes Reiben wieder leicht zu beseitigen, so dass die Blöcke immer wieder für neue Präparate benutzt und signiert werden können. —

Das Signieren der Präparate auf dem Objektträger geschieht meist noch immer mittels Verwendung von Etiquetten oder eines speziellen Buntstiftes, seltener mit dem Schreibdiamanten. All dies ist nicht absolut befriedigend, und besser erscheint die Benutzung chinesischer Tusche für schwarze Schrift und des Kremser Weiss für weisse Schrift unter Anwendung von Soenneckens Zeichenfeder No. 144 (Schiefferdecker) resp. eine Wasserglastinte, d. h. ein Gemisch von Wasserglas mit flüssiger Tusche (Schoebel). —

Die Einbettung der Stücke.

Die Zelloidin-Methode.[2])

Man halte sich zwei Zelloidinlösungen vorrätig, eine dünnflüssige und eine dickerflüssige von Syrupkonsistenz; als Lösungsmittel wird Äther und Alcohol absolutus zu gleichen Teilen verwendet.

---

[1]) Es ist vorteilhaft, schon bei der Sektion die letzte Dorsalwurzel mit einem Faden zu markieren.

[2]) Von Schiefferdecker zuerst angewandt.

Das einzubettende, in Alkohol (60—90 %) entwässerte Stück kommt, nachdem es einen Tag in absolutem Alkohol[1]) (der am besten einmal erneuert wird), einen Tag in Alkohol-Äther verweilt, nun auf mehrere Tage in die dünnere, danach auf ein bis mehrere Tage in die dickere Zelloidinlösung; die Einbettung wird um so besser, je länger sie währt. Entweder lässt man nun das Zelloidin mit dem Präparat im Gefäss erstarren und schneidet sich dann einen Würfel beliebiger Grösse (mit dem Stück) heraus, welcher auf Kork oder Holz oder Stabilit mittels Zelloidin aufgeklebt wird, oder man entnimmt dem noch flüssigen Zelloidin das durchtränkte Präparat und klebt es so mittels mehrfachen Übergiessens mit Zelloidin auf. Am meisten empfiehlt es sich nun, das Eintrocknen unter einer Glasglocke möglichst langsam vorzunehmen, denn die langsam getrockneten Präparate werden viel fester; man kann das Trocknen sogar unter Alkoholdämpfen über mehrere Tage sich erstrecken lassen, wodurch die Konsistenz beinahe die des Paraffins erreicht. Danach hebt man die Stücke bis zum Schneiden in 80prozentigem Alkohol auf, welcher das Zelloidin fest macht (statt Alkohol kann man auch reines Chloroform zum Härten des Zelloidins verwenden, wobei letzteres transparenter bleibt).

Da sich durch absoluten Alkohol sowie Nelkenöl das Zelloidin in den Schnitten löst, so verwendet man, soll dieser Erfolg vermieden werden, nur 96 prozentigen Alkohol resp. ein anderes Öl oder Karbolxylol; andererseits erfordern gewisse Anilinfärbungen geradezu eine Entfernung des Zelloidins aus dem Schnitte, was dann mit absolutem Alkohol und Äther-Alkohol oder Nelkenöl geschehe; nachdem die Schnitte nochmals in absolutem Alkohol und Wasser verweilt, werden sie erst gefärbt.

Der ganze Vorgang ist also folgender:

1) Härten in absolutem Alkohol.

2) Dünnes Zelloidin, dickes Zelloidin (je 1—5 Tage für kleine Stücke, mehrere Wochen bis Monate für eine Hemisphäre).

3) Aufkleben, trocknen lassen, aufbewahren in Alkohol (80 %).

4) Schneiden, Färben, Auswaschen, Entwässern in 96 prozentigem, dann eventuell noch in absolutem Alkohol.

5) Öl oder Karbolxylol, Balsam.

Handelt es sich um brüchige Objekte, so empfiehlt es sich, dem Zelloidin Zedernholzöl (5 gtt. auf ca. 15 ccm.) hinzuzusetzen. (Jordan.)

---

[1]) Grössere Stücke bedürfen mehrerer Tage.

Statt des Zelloidins wird neuerdings auch Photoxylin viel verwendet, das chemisch ihm nahe verwandt, den Vorzug grösserer Transparenz besitzt. Es ist sehr schnell in Äther-Alkohol $\widehat{aa}$ löslich und wird genau wie das Zelloidin behandelt.

Auch das Colloxylin ist verwendbar: Colloxylin 10,0, Ol. Caryophyll. 10,0, dazu Äth. sulf. 60,0 sowie einige Tropfen Alcoh. absol. Das mit Alkohol und Anilin entwässerte Stück bleibt in der mit Äther noch weiter verdünnten Lösung 1—2 Tage. Nach Eindickenlassen des Colloxylins erfolgt dann die Nachhärtung in 80 prozentigem Alkohol. (Tschernischeff.)

Die Paraffin-Methode.

Das einzubettende Stück, das möglichst klein sein soll, kommt nach vollständiger Entwässerung in absolutem Alkohol (8—24 Stunden), auf einen Tag in eine Flasche mit Xylol (statt Xylol kann auch Terpentin, Chloroform oder Zedernöl benutzt werden); in diese Flasche, tut man nun am besten direkt kleine Stückchen Paraffin, bis die Lösung konzentriert ist und überträgt dann das Objekt in geschmolzenes Paraffin auf 2—24 Stunden (im Thermostaten bei ca. 50° C.), wobei es sich empfiehlt, das Paraffin 1—2 mal zu wechseln.

Da der Schmelzpunkt des Paraffins für Erzielung feinster Schnitte von Bedeutung ist, so bereitet man zwei Sorten von verschiedenem Schmelzpunkt (hohem von 55—60° und niedrigem von 42—48°), die mit einander gemengt werden, sodass im Sommer eine härtere, im Winter eine weniger harte Konsistenz, und zwar bei einem Schmelzpunkt von 52—54° C. resp. 48—50° C., zur Verwendung kommen kann.

Nach vollendeter Durchtränkung giesse man die Flüssigkeit samt Präparat in eine niedrige Schale und bringe, nachdem das Präparat entsprechend lokalisiert ist, die Masse schnell durch Übergiessen von kaltem Wasser zum Erstarren, worauf man mittels erwärmten Messers den beliebig grossen undurchsichtigen Block herausschneidet, ihn nach einigem Aufenthalt in kaltem Wasser in die Mikrotomklammer klemmt und mit quer- oder schräggestelltem, nicht befeuchtetem Messer in kurzen Zügen schneidet. Das Rollen des Schnittes kann oft verhütet werden, wenn während des Schneidens der Spatel oder ein Pinsel den Schnitt gegen das Messer drückt. Die Schnitte kommen auf dem Objektträger dann in Xylol, worin das Paraffin sich löst, (bei Osmiumpräparaten besser Chloroform), in Karbolxylol, und in Dammarlack, resp. Kanadabalsam.

Sind sie noch zu färben, so bringt man sie aus dem Xylol in Alkohol, Wasser und in die betr. Färbeflüssigkeit; die Färbung kann jedoch im ganzen Stück auch vorher vorgenommen werden; bei manchen Methoden fand Fixation und Färbung zugleich statt.

Für das Zentralnervensystem kommt die Paraffin-Einbettung im Allgemeinen weniger in Betracht (wenn auch mehr als früher, da gewisse Methoden, wie die von Held, Bielschowsky, Cajal u. a. allerfeinste Schnitte verlangen), denn die grössere Aufmerksamkeit beim Wechseln der Flüssigkeiten, das Entfernen des Paraffins aus dem Schnitt mit der mangelnden Fixierung von lockeren Bestandteilen sind grosse Nachteile, zumal das Vorfärben in toto meist nicht angeht und das Nachfärben der brüchigen Schnitte, selbst auf dem Objektträger oft schwierig ist. Auch lassen sich grosse Schnitte nicht herstellen.

Was die Einwirkung der hohen Temperaturen von über 50° betrifft, bei welchen die Durchtränkung vorgenommen wird, so ruft sie einerseits eine starke Schrumpfung hervor, die des weiteren noch vermehrt wird durch die Volumverminderung, welche das Paraffin beim Erstarren erleidet. Diese Verminderung ist beträchtlicher als man glaubt und beträgt nach neuen Versuchen, wie Spalteholz mitteilt, bei Schmelzpunkt 52° C. mindestens 12%; dass die Schrumpfung des Präparates selbst keine gleichmässige ist, kommt beim Nervensystem, das ja ziemlich homogen gebaut ist, weniger in Betracht, als an den Organen, wo derbere und weichere Gewebe unmittelbar nebeneinander sich befinden; nach dem Gesagten ist aber einleuchtend, dass bei zirkumskripter Gliose z. B. ungleichmässigere Schrumpfung sich geltend machen kann. Dass das Paraffin die Gewebe, etwa so, wie das Wasser es tut, bis in die feinsten Teile durchdringt, wird neuerdings nicht mehr durchwegs angenommen, vielmehr dürfte es dieselben wohl nur einhüllen, da die organischen Substanzen ihre Färbbarkeit und Löslichkeit behalten.

Da nach Heidenhain eine gleichmässige Durchtränkung und Abkürzung des Aufenthaltes in hoher Temperatur durch den Schwefelkohlenstoff bewirkt wird, so sei auf diese jetzt viel gebrauchte Methode hier auch hingewiesen, die sich folgendermassen gestaltet:

1) Alkohol absol,
2) Alkohol und Schwefelkohlenstoff āā,
3) Reiner Schwefelkohlenstoff (einmal zu wechseln),
4) gesättigte Lösung von Paraffin (55° Schmelzpunkt) in Schwefelkohlenstoff bei 30° (auf dem Thermostaten von 36°),
5) analoge Lösung bei 40—42° gesättigt (Thermostat von 56°),
6) Reines Paraffin (einmal zu wechseln) ½—1½ St.

Dass Schwefelkohlenstoff feuergefährlich ist und schlecht riecht, sei jedoch besonders betont; in ersterer Hinsicht ist wohl deshalb Tetrachlorkohlenstoff (Plecnik) vorzuziehen. —

Ferner kann man den Aufenthalt im absoluten Alkohol abkürzen, wenn man das stark entwässernde Anilinöl verwendet; dann kommen die Stücke aus

dem Alkohol in Anilinöl (im Ofen) in 2—3 mal gewechseltes Xylol (bis keine gelbe Farbe mehr abgeht) in Xylolparaffin und Paraffin. —

Zur Erleichterung der Paraffin-Einbettung hat Frankl einen Hülfsapparat konstruiert, der aus einer quadratischen und blanken Glasplatte von 15 cm Länge besteht, auf welche man 4 ganz gleiche, fünfseitige Glasklötze mit matten Grundflächen (1 cm hoch) legt; ihre blanken Seitenflächen sind je 35, 30, 22, 19 und 14 mm lang. Durch Zusammenstellen dieser Klötze lassen sich 5 Quadrate von verschiedener Seitenlänge zusammenstellen, so dass jedesmal ein Hohlraum dazwischen entsteht. In diesen Raum giesst man das leichtflüssige Paraffin schnell hinein, legt das Objekt in gewünschter Lage ein und bedeckt letzteres eventuell noch weiter mit Paraffin.

Auf die **kombinierte Zelloidin-Paraffinmethode** möge nur kurz hingewiesen werden; sie besteht in folgendem:

1. Übertragen des Objekts in Äther-Alkohol āā, einige Stunden.
2. Durchtränken mit mässig dicker Zelloidinlösung, 24 Stunden.
3. Ol. Origani; übertragen in eine Mischung von Ol. Origani und Paraffin, die bis auf höchstens 40° erwärmt ist.
4. Übertragen in geschmolzenes Paraffin; dann wie bei der Paraffineinbettung weiter behandeln.

Das Aufkleben der Paraffinschnitte auf dem Objektträger begegnet hin und wieder Inkonvenienzen, woraus sich die Mannigfaltigkeit der angegebenen Methoden erklärt; unter diesen sind die gebräuchlichsten die von Gulland mittels Wasser, von Rabl mittels einer Mischung von Nelkenöl mit Kollodium, von Mayer mit Eiweissglyzerin, von Strasser die Kollodium-Rizinusölmischung, die von Heidenhain, wobei zur Vermeidung von Schrumpfungen ein langsames Verdunsten des auf den Objektträger gebrachten Wassers bei einer Temperatur von nicht über 35° das Wesentliche ist, sowie die japanische Methode.

Bei dem ersten Modus verfährt man entweder so, dass man den Schnitt direkt vom Messer auf den mit erwärmtem Wasser bedeckten Objektträger bringt, das Wasser mit Fliesspapier absaugt und das Glas mit dem festhaftenden Schnitt in dem Thermostaten bei ca. 35° auf 6—24 Stunden belässt, oder den Schnitt erst in einer flachen Schale mit warmem Wasser ausbreitet und auf dem Objektträger auffängt. Das Festhaften geschieht in jedem Falle durch Kapillarattraktion. — Eiweissglyzerin andererseits verstreicht man in dünner Schicht auf dem Objektträger, der dann mit dem aufgelegten Schnitt für einige Zeit in den Thermostaten bei ca. 60° kommt, wo die Schnitte fest ankleben. Bei der japanischen Methode, die die beiden vorigen eigentlich nur kombiniert, wird ebenfalls wenig Eiweissglyzerin verstrichen, auf den so behandelten Objektträger etwas erwärmtes Wasser gebracht, die Schnitte aufgelegt und durch leichte Erwärmung über der Flamme gänzlich ausgebreitet. Nach Abfliessen des Wassers bleibt das ganze Präparat während einiger Stunden im Thermostaten bei ca. 35°

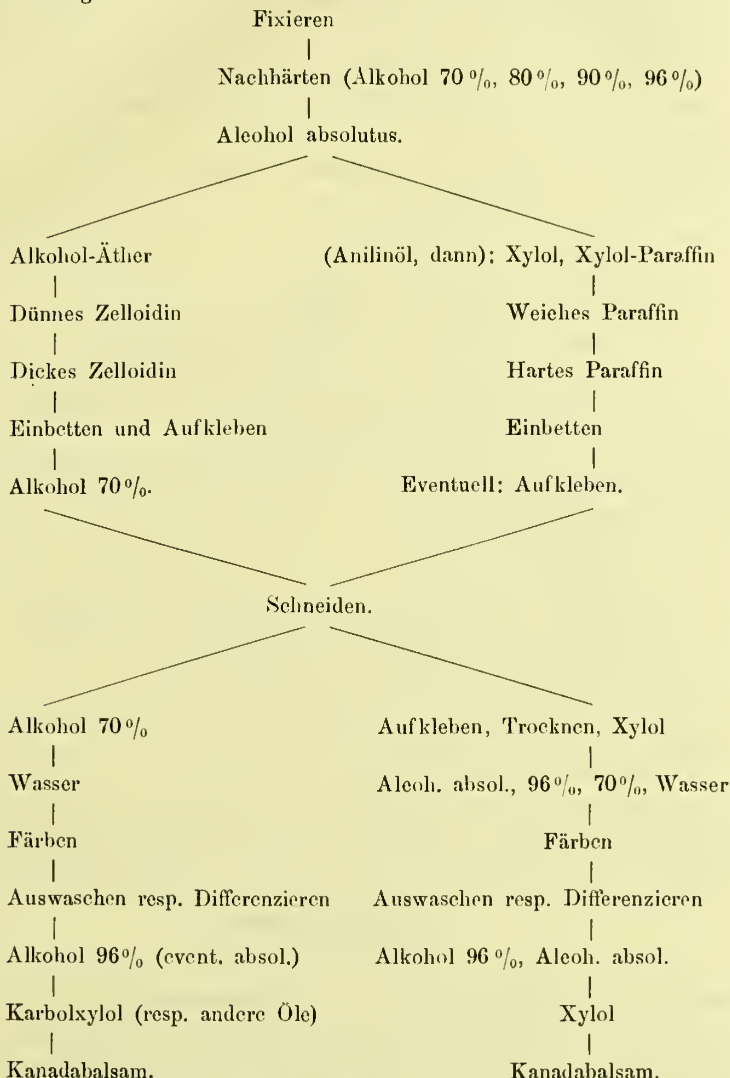
Weiterhin ist ein Verfahren empfohlen worden (Albrecht und Störk), das verschiedene Übelstände genannter Methoden vermeiden soll, und sich zugleich als eine Überführung von Paraffinschnitten in Zelloidinschnitte dokumentiert.

Der Vorgang ist folgender:

1. Auf den angehauchten Objektträger wird ein Tropfen Wasser verstrichen, dann werden die Paraffinschnitte aufgelegt.
2. Anpressen der Schnitte mit feinem Filtrierpapier (in mehrfacher Lage), auf das vorher etwa 5 Tropfen Alkoh. absol. aufgeträufelt wurden.
3. Lösen des Paraffins durch Xylol: Verdrängen des letzteren mit Alc. absol.
4. Übergiessen des Schnittes mit einigen Tropfen einer ganz dünnen Zelloidinlösung auf dem schief gehaltenen Objektträger.
5. Alkohol (95 %). Übertragen des Präparates in Wasser zu beliebiger Weiterbehandlung.

Ist eine Einbettung in Zelloidin oder Paraffin unerwünscht, weil die alkohol- und ätherlöslichen Stoffe in dem Gewebe erhalten bleiben sollen, und will man trotzdem auf feine Schnitte nicht verzichten, so mag man nach dem Vorschlag von Döllken eine Natronseifeneinbettung versuchen. Rizinusöl wird in kochende 20—30 proz. Natronlauge derart eingetragen, dass NaOH in geringem Überschuss vorhanden ist. Die Lösung muss noch einige Zeit kochen, dann erkalten und erstarren; die überflüssige Natronlauge wird aus dem Seifenkuchen ausgepresst. Zur Einbettung benutzt Döllken eine 3 bis 5 proz. Seifenlösung (bei 35—40° C.), in welcher die Organteilchen mit oder ohne Auswaschen aus dem Formol resp. Müllerscher Lösung gebracht werden. Stehenlassen bei gleicher Temperatur (36—72 Stunden) in bedeckter Schale, eindunsten lassen bis zur Erstarrung. Aufgekittet werden die reichlich gross geschnittenen Blöcke mit Wasserglas auf Holz. Nach dem Eintrocknen wird mit trockenem Messer geschnitten, die Schnitte strecken sich beim Übertragen in Wasser glatt. Vor der Färbung wird in Wasser gut ausgewaschen. Noch schneller als mittels Formol gelingt die Fixierung und Härtung mit Aceton. Schnitte sind in Serien und 5—10 μ dick auf diese Weise leicht zu erzielen.

Schema zur Herstellung des mikroskopischen Präparates bei Zelloidin- resp. Paraffineinbettung:



Die Gefrier-Methode.

Das Stückchen, welches möglichst dünn sein soll (unter 5 mm), damit eine gleichmässige Erkältung stattfinden kann, wird in dem Gefriermikrotom auf eine Metallplatte gelegt, gegen welche von unten her ein Ätherspray wirkt. Vollkommenes vorheriges Durchwässern ist absolut geboten, damit das Objekt unter dem helfenden Druck eines

Spatels oder Skalpellgriffs auch wirklich fest anfrieren kann. Bei vorheriger Härtung in Spiritus und auch bei bereits vorhandener Celloidineinbettung lasse man eine ganze Nacht durchwässern, bei vorheriger Anwendung von Kalium bichromicum genügt eine kurze Durchwässerung, welche speziell für etwaige Weigertsche Markscheidenfärbung nicht kurz genug sein kann.

Hamilton hat eine besondere Methode angegeben, für Zelloidineinbettung der Stücke bei nachherigem Gefrierenlassen.

1. Das gehärtete Stück kommt auf 3—4 Tage in Alkohol und Äther-Alkohol.
2. Einbettung in Zelloidin (4 Tage).
3. Der Zelloidinblock mit dem Stück Gehirn kommt auf 1 Tag in Wasser, dann auf mehrere Tage in die Flüssigkeit A. oder B.; danach erfolgt das Gefrieren und Schneiden.

Als Gefrierflüssigkeiten empfiehlt Hamilton folgende beiden, bei deren Anwendung jede Läsion der Stücke vermieden werde:

1. ein Syrup, hergestellt aus $28^1/_2$ gr reinen Zuckers auf 30 gr Wasser unter Sättigung mit Acid. boric. während des Kochens und mit Filtrieren nach dem Erkalten.
2. ein Mucilago aus 45,6 gr Gumm. arab. auf 2400 gr Wasser gesättigt und filtriert wie oben.

Flüssigkeit A. Syrup 4 Teile, Mucilago 5 Teile, Wasser 9 Teile, Kochen, mit Sättigung mittels Acid. bor., kalt filtrieren.

Flüssigkeit B. 2 Teile von A., Syrup 1 Teil.

Flüssigkeit. C. Syrup 4 Teile, Mucilago 5 Teile.

A. lässt am härtesten, C. am weichsten gefrieren, mindestens müssen die Stücke eine Woche in der Flüssigkeit bleiben.

Ein grosser praktischer Nutzen ist dieser Methode wohl wegen der langen Dauer nicht beizumessen, wie auch überhaupt die Gefriermethode im allgemeinen für unsere Zwecke ziemlich entbehrlich scheint, und hauptsächlich für die Fibrillenfärbung Bielschowskys neben der Paraffineinbettung zu empfehlen ist.

Mikrotome.

Die Instrumente, welche zum Anfertigen der Schnitte erforderlich sind, sind a) das Mikrotom, b) das Mikrotommesser.

Bau, Handhabung, Prinzip und Wirkung der Mikrotome mögen als bekannt vorausgesetzt werden, und ich beschränke mich daher darauf, dass für grosse Gehirnschnitte die Mikrotome von Becker (Göttingen), von Schanze (Leipzig), und das nach Gudden genannte von Katsch (München) angefertigte die rationellsten sind, für mittlere und kleinere Schnitte das von Schanze und Miehe (Hildesheim).

Für Paraffin- und Gefrierschnitte sind die von Jung (Heidelberg) angefertigten Mikrotome empfehlenswert.

Das von Valentin angegebene Doppelmesser, welches zum Anfertigen frischer Schnitte verwendet wird, hat heute fast nur noch ein historisches Interesse, besonders auf unserem Gebiete, es ist durch das Gefriermikrotom resp. die so abweichende Art moderner Technik überflüssig gemacht worden.

Was die zum Schneiden erforderlichen Messer[1]) betrifft, so können sie nicht sorgfältig genug gearbeitet sein; man achte stets darauf, bei Zelloidinpräparaten in sanftem kontinuirlichen Zuge, ohne Druck und Absetzen, zu schneiden.

Für das Aufkleben der in Zelloidin eingebetteten Objekte stehen Holzklötze, Kork und Stabilit zur Verfügung, von denen jeder seine Vor- und Nachteile hat. Während die beiden ersteren leicht zu bearbeiten und billig zu beschaffen sind, ist Stabilit ungleich teurer und selbst mit Säge und Feile nicht ganz einfach zu formen.

Andererseits ist Stabilit in Alkohol unlöslich und sinkt in Flüssigkeiten unter, während sich bekanntlich Kork stark mit Alkohol imbibiert. weicher wird und oft so schräg auf der Oberfläche schwimmt, dass ein Teil des Präparates herausragt. Der Hauptnachteil des Korkens aber besteht bekanntlich darin, dass er viel Tannin enthält und dieses dem Alkohol mitteilt, wodurch die Färbbarkeit der Präparate nach einigem Verweilen in Alkohol immer mehr nachlässt. Entscheidet man sich für Stabilit, so möchte ich nur die Platten mit geriefter Oberfläche empfehlen, da an platter Oberfläche das Zelloidin schlecht haftet und sich das Präparat gerade während des Schneidens oft loslöst, zumal die flachen Platten sich unter Alkoholwirkung gern etwas „werfen". —

Serienschnitte nach Weigert, Obregia und Apáthy.

In vielen Fällen, besonders zur genauen Verfolgung auf- und absteigender Degenerationen der Medulla spinalis ist es nötig, Schnittserien ohne Unterbrechung anzufertigen; die Vorbedingungen zu guten Resultaten sind hier vollkommene Einbettung und ein absolut gutes Messer.

Weigerts Methode der Herstellung von Serienschnitten ist bei

---

[1]) Die vorzüglichsten Mikrotommesser sind die von Wilh. Walb (Heidelberg resp. Frankfurt a. M.) hergestellten; beim Abziehen auf dem Walbschen Streichriemen ist die Abziehvorrichtung, beim Anfertigen von grössten oder längsten Schnitten die Stützvorrichtung zur Vermeidung des „Federns" zu benutzen.

all ihrer Einfachheit ausserordentlich zweckmässig. Eine oder mehrere gereinigte Glasplatten werden mit Kollodium übergossen; mit Streifen von Klosetpapier, etwas breiter als die Präparate, werden die Schnitte vom Messer abgenommen, so dass jeder folgende immer rechts vom vorherigen liegt; diese Streifen numeriert man und legt sie auf einen Teller, dessen Boden mit mehreren Lagen Fliesspapier, das mit 80prozentigem Alkohol befeuchtet wurde, bedeckt ist. Die Schnitte mögen nach oben liegen. Auf die Glasplatte resp. Objektträger legt man 1–2 solche Schnittstreifen, indem die Streifen Klosetpapier mit den Präparaten nach unten auf die Kollodiumschicht gedrückt werden, worauf sich der Streifen leicht abziehen lässt, während die Präparate auf dem Kollodium anhaften; dann wird eine zweite Kollodiumschicht über die Schnitte schnell ausgegossen. Eine Numerierung mit Methylenblau mag nicht vergessen werden. Die Glasplatte wird nun entweder in Alkohol (80prozentig) bewahrt oder in die Färbeflüssigkeit übertragen, woselbst sich, besonders im Brutofen, bald die Kollodiummasse in toto vom Glas abhebt, und nun die übliche Weiterbehandlung stattfinden kann.

Die von Obregia angegebene Methode bietet den Vorteil, dass sie fast auf alle Arten Schnitte, auch auf solche von nicht eingebettetem Material, anwendbar ist. Man überzieht den Objektträger mit einem Gemisch von 3 Teilen Zuckersyrup, 2 Teilen Alkohol (95 %) und 1 Teil durchsichtigen Dextrinsyrup und lässt sie 2—3 Tage liegen, bis sie, mit feuchtem Finger berührt, gerade noch kleben. (Dextrin verhindert den Zucker am Krystallisieren.) Die Zelloidinschnitte bringt man auf Klosetpapier oder satiniertes Seidenpapier (satinierte Seite oben), das in einer Schale mit 95 prozentigem Alkohol feucht gehalten wird, nimmt das Papier aus der Schale und drückt es, die Präparate nach unten, mittels Fliesspapier auf den Objektträger. Ist der Alkohol verdunstet, so übergiesst man die Schnitte mit einer mässig dicken Zelloidinlösung in dünner Schicht und lässt trocknen; danach kommen die Platten (Objektträger) in Wasser, wo sich der Zucker auflöst, so dass die Serienschnitte sich abheben und nun gefärbt und weiterbehandelt werden können.

Handelte es sich um Paraffinschnitte, so werden diese 10 Minuten lang auf dem Objektträger auf ca. 58° erwärmt, letzterer dann in Xylol und absol. Alkohol gebracht, und nachdem dieser abgetropft und verdunstet ist, mit Zelloidinlösung übergossen. Nach 10 Minuten bringt man den Objektträger in Wasser, wo sich die Zelloidinschicht mit den Schnitten leicht vom Glas abhebt.

Apáthy ordnet die Schnitte auf dem mit gelbem Vaseline eingefetteten und mit 70—90 % igem Alkohol benetzten Messer mittels einer Nadel. Die Schnitte werden in Reihen geordnet, so dass sie sich mit ihren Rändern berühren, resp. übereinander greifen, und danach mit Fliesspapier abgetrocknet, sowie mit konzentrierter Zelloidinlösung bepinselt. Nach dem Verdunsten (ca. 5 Minuten) benetzt man sie mit 70 % igem Alkohol und schneidet weiter resp. legt das Messer, sobald es voll, mit den Schnitten in 70 % igen Alkohol. Dieser härtet das Zelloidin zu einer einzigen Membran, die man mit einem Skalpell leicht vom Messer wegnehmen und weiterbehandeln (färben) kann. Am besten aber bringt man sie direkt auf den Objektträger, klebt sie an den Rändern mit Äther-Alkohol fest und bringt sie in die Farbe.

Darkschewitsch hat als die einfachste Methode zur Aufbewahrung von Serienschnitten empfohlen, jeden Schnitt mittelst eines numerierten und entsprechend grossen Stückes Fliess- oder Klosetpapier vom Messer abzunehmen, nachdem das Papier zuvor gut in Alkokol getränkt war; die einzelnen Blätter mit den anhaftenden Schnitten werden der Numerierung nach aufeinander gelegt und können in einem entsprechend hohen Glasgefäss in Alkohol beliebige Zeit aufbewahrt werden. Die weiteren Prozeduren der Färbung etc. werden vorgenommen, ohne dass man die Schnitte von dem Papier loszulösen versucht.

Um grosse Gehirnschnitte herzustellen, hat Lissauer folgende Behandlung angegeben:

1. Einbetten in weiches Paraffin.
2. Schneiden; entweder vor jedem Schnitte Überziehen der Schnittfläche mit dünner Zelloidindecke, oder besser: man klebt vor jedem Schnitte einen Streifen Seidenpapier glatt mit einer dicklichen Dextrinlösung (aber in dünnster Lage) auf.
3. Der an dem Papier haftende Schnitt wird durch Eintauchen in Zelloidinlösung noch besser befestigt und dann samt Papier weiter behandelt. Liegt er aufgeklebt auf dem Objektträger, so lässt sich das Papier leicht ablösen.

Die Herstellung von totalen Durchschnitten des menschlichen Gehirns ist im allgemeinen sehr schwer; indessen gelingt sie doch zur Zufriedenheit mit den Mikrotomen nach Gudden und von C. Reichert, indem in beiden Fällen unter Wasser geschnitten wird, sowie mit dem grossen Schanzeschen Mikrotom. Ich möchte hier, da zudem zu Demonstrationszwecken Totaldurchschnitte gebraucht werden, den Vorgang angeben, wie ihn Pal schildert.

Die Gehirne werden mit Müllerscher Flüssigkeit, der $^1/_4$ Vol. 5 proz. Lysollösung zugesetzt ist, injiziert, dann in ebensolcher Flüssig-

keit (Kal. bichrom., Lysol) gehärtet, und zwar im Dunkeln und bei Zimmertemperatur.

Die einzelnen dünner geschnittenen Stücke trocknet man mit Fliesspapier ab, überträgt sie (ohne Auswässerung), nach kurzem Aufenthalt in Alkoh. absol., in Photoxylin und klebt sie alsdann auf eine rauhe Metallplatte auf; letztere ist auf einem kleinen Holzstück fixiert, welches in die Objektklammer passt. (Holzplatten „verziehen“ sich zu leicht innerhalb der Reihe von Tagen, welche die Vollendung der Serie erfordert.) Nach Pal dauert das Herstellen eines Gehirnschnittes (von nicht weniger als 50 μ Dicke) nur 10—15 Sekunden. Der in das Wasser fallende Schnitt wird mit Klosetpapier aufgefangen. Um ihn gut färben zu können, bringt man ihn auf eine mit Kandiszucker-Dextrinmischung überzogene Platte; hier haftet er ganz (wie bei den Abziehbildern) an der Platte resp. Zuckerschicht, wenn man das Papier entfernt. Über das abgetrocknete Präparat giesst man eine dünne Photoxylinschicht gleichmässig hinüber, presst sie, wenn sie trocken ist, mit einer Rolle an, und legt die Platte dann in Wasser, in welchem sich die Dextrinschicht löst, so dass also das Präparat mit der adhaerenten Photoxylinunterlage abfällt. Da eine Fläche frei liegt, so ist der Schnitt für Färbung und Differenzierung leicht zugänglich. Entwässerung und Aufhellung erfolgt endlich auf dem Objektträger und das fertige Präparat wird mit dünnem Objektträger bedeckt.

Im allgemeinen ist für alle Präparate, von denen man dünne und grosse Schnitte herstellen will, zumal wenn die Stücke leicht bröckeln oder Lakunen aufweisen, die sogenannte „Collodionage des surfaces“ von Duval zu verwenden: man bläst dann die Schnittfläche jedesmal trocken, drückt kurz und ganz vorsichtig Fliesspapier auf sie und überdeckt sie mit einer ganz dünnen Kollodiumschicht, an welcher dann der feine Schnitt festhaftet.

Ich möchte hier endlich noch darauf hinweisen, dass zumal für die ganz grossen Gehirnschnitte es manchmal möglich und nützlich ist, die teuren Deckgläschen oder dickeren Glasplatten durch Glimmerplättchen zu ersetzen.

Der einzige Vorwurf, den man dem Glimmer machen kann, dass er leicht zu lädieren ist, fällt deshalb nicht so schwer ins Gewicht, weil es sich bei Betrachtung oder Demonstration grosser Schnitte wohl meist nicht um feinste Zell- oder Faserverhältnisse handelt.

Man hat aber den Vorteil, sich jederzeit beliebig grosse und dabei doch äusserst dünne Plättchen leicht und billig herstellen zu können, sobald man nur die Spaltung des Glimmers unter der fliessenden Wasserleitung mittels eines feinen Skalpells vornimmt.

Andererseits weist Nissl mit Recht darauf hin, dass die schwereren Glasplatten gerade durch ihr Gewicht eine glattere Ausbreitung grosser Schnitte bedingen.

Serien-Längsschnitte durch das ganze Rückenmark

bei Anwendung der Marchischen Methode.

Bei der grossen Bedeutung der experimentellen Untersuchungen der sekundären Degenerationen, die im Rückenmark nach Quer- und Längsdurchschneidung desselben oder einzelner Teile auftreten, ist es wichtig, die Entartung einzelner Fasern und ganzer Bahnen genau zu verfolgen. In der letzten Zeit hat man die Marchische Methode mit Recht hauptsächlich und fast ausschliesslich für solche Untersuchungen angewandt; diese letztere Methode erlaubt uns ja nicht nur die compacte, sondern auch die lockere Degeneration der Markfasern zu unterscheiden. Wenn man sich bei den genannten Untersuchungen nur der Querschnitte bedient, so kann man leicht den Fehler begehen und eine zerstreute Degeneration dort vermuten, wo dieselbe eigentlich nicht existiert.

Man findet nämlich stets im normalen menschlichen und tierischen Zentralnervensystem bei Anwendung der Marchischen Methode auf den Querschnitten ziemlich zahlreiche zerstreute schwarze Punkte, die meistens klein und rundlich sind, aber auch grössere und unregelmässige Formen zeigen können.

Da man auf Grund unserer jetzigen Kenntnisse noch nicht imstande ist, eine absolut sichere Erklärung dafür zu geben, so ist es jedenfalls für die experimentellen Untersuchungen des operierten Rückenmarks wichtig, dass man auf Längsschnitten im normalen Rückenmark die charakteristischen degenerierten Fasern mit der kettenartigen Anordnung der Schollen (Marchische Methode) im grossen und ganzen vermisst.

Deshalb ist es erforderlich, sich bei experimentellen Untersuchungen nicht nur auf die Anfertigung von Querschnitten zu beschränken, sondern auch Serienlängsschnitte herzustellen.

Zerlegt man aber das Rückenmark in einzelne Segmente und zerschneidet letztere in eine Serie von Längsschnitten, so ist es schwer,

die entsprechenden degenerierten Faserzüge und besonders die einzelnen zerstreuten Fasern aus verschiedenen Segmenten in kontinuierlichen Zusammenhang zu bringen; aus diesem Grunde hat E. Flatau bei Untersuchungen der sekundären Degeneration ununterbrochene Längsschnittserien von der Medulla oblongata an bis zur Cauda equina inkl. (bei Hunden) hergestellt und sich dabei folgender Methodik bedient:

Das Rückenmark des operierten Tieres wurde 2—3 Wochen nach der Operation in toto herausgenommen; an die Cauda equina wurde ein Gewicht (Glasstäbchen) angehängt, wodurch die sonst unvermeidlichen Schlängelungen des Rückenmarks vermieden wurden. Durch die dura mater der oberen Rückenmarksteile (distales Ende der Medulla event. oberes Ende des Halsmarks) wurden 2 Fäden einander gegenüber gezogen und das Rückenmark in einem ca. 40 cm hohen und 3—4 cm breiten Glaszylinder in Müllerscher Flüssigkeit aufgehängt, event. vorher 1 Tag in 10prozentiger Formollösung und dann erst in Kal. bichrom. Die Fäden wurden über den Bord des Zylinders gelegt und durch den beschwerten Glasdeckel festgehalten, so dass das Mark frei in der Flüssigkeit und in der Mitte des Zylinders zugleich schwebte.

Nach einem Tage wurde die dura mater entlang der vorderen und hinteren Fläche des Marks durchschnitten und letzteres wiederum in der Flüssigkeit aufgehängt; dort blieb es ca. 2—3 Wochen, wurde danach herausgenommen und die Fäden an einem Stativ befestigt; das Rückenmark schwebte nun frei in der Luft und wurde mit dem feinen Gräfeschen Starmesser der Länge nach in der Mittellinie (Sulcus longitudinalis anterior und septum longitudinale posticum) gespalten, wobei bemerkt werden mag, dass diese Manipulation am besten unter Assistenz durchgeführt wird, indem der eine den sulcus longitudinalis anterior und der andere das septum longitudinale posticum im Auge behält.

Der Zweck dieser Spaltung ist, das Eindringen der Marchischen Flüssigkeit zu erleichtern. Der unterste Teil des Conus medullaris in der Cauda equina wird dabei nicht gespalten, damit das Rückenmark unten seinen Zusammenhang bewahrt und beide Hälften später wieder leicht zusammengefügt werden können.

Nunmehr hängt man das Rückenmark in den jetzt mit Marchischer Flüssigkeit zu füllenden Zylinder; letzterer wird am besten an einen warmen Ort (am Ofen) gestellt; Überhitzung ist zu vermeiden.

Auch hier ist es (wie bei Bearbeitung des Gehirns) ratsam, die allmähliche Steigerung der Konzentration der Marchischen Flüssigkeit

(in Bezug auf Osmiumsäure) anzuwenden. Anfangs wechselt man öfters, dann seltener, der Osmiumgeruch muss jedoch stets deutlich sein.

3—5 Wochen (je nach der Grösse des operierten Tieres) verweilt das Mark in der Flüssigkeit; die weiteren Manipulationen werden in demselben Zylinder vorgenommen ohne Herausnahme des Objekts. (24 Stunden Ausspülen in fliessendem Wasser, Alkohol, Zelloidineinbettung.)

Das mit Zelloidin völlig durchtränkte Mark wird herausgenommen und auf einem besonders angefertigten Holzklotz aufgeklebt. Zu verwenden ist das Bekkersche grosse Mikrotom. Das untere Klemmstück und die Objektplatte des Klotzes sind aus einem Stück Eichenholz angefertigt; ersteres entspricht der Öffnung zwischen den Mikrotomklemmen, letztere der Länge des Rückenmarks (ca. 35—40 cm lang, 5 cm breit).

Das viereckige Klemmstück steht unter einem Winkel von ca. 45° zur Längsachse der Platte, so dass letztere nicht parallel mit der Schlittenführung, sondern unter diesem Winkel sich befindet. Auf die Objektplatte wird zur Stütze des Präparates eine entsprechend lange und breite erstarrte Zelloidinschicht von etwa 6—8 mm Höhe mit Kollodium aufgeklebt, auf welcher erst das Rückenmark aus dem dickflüssigen Zelloidin befestigt wird. Nach völligem Erstarren des Präparats wird der ganze Block in ein langes Glasgefäss mit 80prozentigem Alkohol gebracht.

Die Anfertigung der Schnittserien stellt dann bei entsprechender Stellung des Messers und unter Anwendung der oberflächlichen Kollodiumschichten keine besonderen Schwierigkeiten dar. Die 60—80 μ dicken Schnitte werden direkt mit den Fingern vom Messer abgezogen und zur weiteren Bearbeitung in Alkohol und Karbolxylol, danach auf entsprechend lange Objektträger gebracht. —

Diese Methode kann gute Dienste dort leisten, wo es sich um Verfolgung und genaue topographische Feststellung von pathologischen lang ausgedehnten und multiplen Herden handelt, so z. B. bei Hämatomyelie, Syringomyelie, Multipler Sclerose etc. —

Für die mikroskopische Betrachtung dieser Längsschnitte, wie auch anderer grosser Präparate (Gehirndurchschnitte etc.) eignet sich besonders gut der von Nebelthau angegebene Apparat, dessen Hauptprinzip eine ausgiebige Beweglichkeit des Objekttisches und des Tubus ist.

Die Öle (Aufhellungsmittel) und Harze.

Nur mit wenigen Worten möge auf die Behandlung hingewiesen werden, welche allen gefärbten Schnitten zuteil werden muss, sobald

sie entwässert worden sind; die Entwässerung selbst geschieht in absolutem Alkohol, oder in nur 96 prozentigem Alkohol, falls ein Auflösen des Zelloidins vermieden werden soll; nach Nikiforoff mag auch zur Erzielung des letzteren Zweckes eine Mischung von Chloroform und Alkoh. abs. zu gleichen Teilen verwendet werden.

Von den Ölen ist das sonst so gebräuchliche Nelkenöl mit der oft willkommenen, oft aber störenden Eigenschaft begabt, das Zelloidin aufzulösen. Ausserdem zieht es die meisten Anilinfarben aus und lässt dadurch allmählich die Färbung schlecht werden, so dass es sich also im allgemeinen wenig für unsere Zwecke eignet.

Die anderen Öle, wie Origanum-, Bergamott-, Kajeput-Öl und auch Terpentine sind gegenüber Zelloidin wie gegen Anilinfarben indifferent; Zedernöl nur gegen letztere. Am besten aber hat sich als Aufhellungsmittel das Xylol bewährt und daher jetzt völlig eingebürgert; nur muss zuvor eine völlige Entwässerung mit absolutem Alkohol vorgenommen werden und der Schnitt nicht zu lange im Xylol verweilen, damit er nicht schrumpft. Ist es von Wichtigkeit, ein Auflösen des Zelloidins zu vermeiden und geschah die Entwässerung daher nur im 96 prozentigem Alkohol, so gebraucht man nach Weigert Karbolxylol im Verhältnis 1 : 3, welches bereits in wenigen Sekunden das Aufhellen der Haematoxylin- und Karminpräparate vollendet, oder aber man benutzt die sehr empfehlenswerte Fliesspapierabtrocknung, indem man nach Anwendung derselben Xylol auftropfen lässt, wiederum abtrocknet und Xylolauftropfung repetiert; dann sind die Schnitte so hell, als wenn man vorher absoluten Alkohol angewendet hätte.

Das Karbolxylol kann immer wieder nach Filtrieren benutzt werden, wenn man weissgeglühtes Kupfersulfat in die Flasche getan; sobald sich letzteres gebläut hat, muss es (ganz wie bei der Verwendung zur Herstellung absoluten Alkohols) durch neues ersetzt werden. Eine hinreichende Mischung ist folgende:

Xylol. purissimi	45,0
Acid. carbol.	15,0
Cupr. sulfur. usti	40,0. —

Für Tinktionen mit Anilinfarben empfiehlt es sich, statt Karbolxylol — Anilinölxylol im gleichen Verhältnis von 1 : 3 zu benutzen.

Die weitere Behandlung der Schnitte ist nach ihrer Aufhellung überall die gleiche: völliges Abtrocknen mittels Filtrierpapier in mehrfacher Lage, Dammarlack oder Kanadabalsam, Deckgläschen.

Zur Herstellung von Dauerpräparaten — und wir arbeiten ja fast ausschliesslich in unserem Gebiete mit solchen -- bedürfen wir endlich noch der Harze, von denen hauptsächlich folgende drei in Betracht kommen: Kanadabalsam, Dammarlack und Kolophonium; das Aufheben der Präparate in Glyzerin, das manchmal bei Golgischer Methode angewendet wird, ist immer umständlich; das Venetianische Terpentin bedarf mehrerer Monate, bis es so hart wie Kanadabalsam wird.

Den Kanadabalsam löst man sich in Chloroform oder Xylol, bis er gewünschte Konsistenz erlangt; Terpentinlösungen lassen Hämateïnfärbungen oft abblassen, eignen sich aber für Weigerts Neurogliamethode ausgezeichnet.

Dammarlack wird von manchem, ausser bei Hämatoxylinpräparaten, dem Kanadabalsam vorgezogen, da bei ihm die feineren Details des Präparates angeblich besser erscheinen und er auch schneller erstarrt. Man löst ihn in gleichen Teilen von Benzin und Terpentin.

Kolophonium, in Benzin oder Chloroform gelöst, hauptsächlich bei Nissls Methylenblaufärbung angewendet, hat den Vorzug, nicht nach einiger Zeit gelb zu werden.

Literatur.

Albrecht und Störk. Beitrag zur Paraffin-Methode. Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk. XIII. 1897.

Apathy. Aufkleben von Zelloidinschnitten. Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. VI. 1889 p. 168.

Blum, F. Formaldehyd. Encyclop. der mikrosk. Technik. 1903 p. 391.

Döllken. Einbettung von Gewebeteilen ohne Alkoholhärtung. Zeitschr. f. wiss. Mikr. XIV. 1897.

Flatau. Serienlängsschnitte durch das ganze Rückenmark. Anat. Anz. 1897.

Frankl. Einbettklötze für Paraffinobjekte. Zeitschr. f. wissensch. Mik. XIII 1897.

Gerota. Contribution à l'étude du formol dans la technique anatomique. Journ. internat. d'Anat. et de Phys. T XII. F 3. 1896.

Lissauer. Herstellung grosser Gehirnschnitte. Zeitschr. f. Psych. 1889.

Marina. Fixationsmethode für Nissls und Weigerts Färbung. Neurol. Zentralbl. 1897 No. 4.

Nebelthau. Mikroskop und Lupe zur Betrachtung grosser Schnitte. Zeitschr. f. wiss. Mikr. XIII 1897.

Nikiforoff. Einschliessen der Schnitte in Alkohol-Chloroform. Zeitsch. f. wissensch. Mikr. VIII 1891.

Obregia. Schnittserien. Neurol. Zentralbl. IX. 1890 p. 295.

Orth. Über die Verwendung des Formaldehyds. Berl. klin. Wochenschr. 1896. No. 13.
Pal. Über ein neues grosses Mikrotom f. Gehirnschnitte. Zeitschr. f. wiss. Mikr. X. 1893.
Schiefferdecker. Signieren von Präparaten. Zeitschr. f. wiss. Mikr. XIII 1897.
Schöbel. Signieren von Präparaten. Zeitschr. f. wiss. Mikr. XIII 1897.
Siemerling. Technik. Berl. klin. Wochenschr. 1899 No. 32.
Spalteholz. Mikroskopie und Mikrochemie. 1904. Leipzig S. Hirzel.
Stepanow. Über die Anfertigung feiner Zelloidinschnitte vermittels Anethols. Zeitschr. f. wiss. Mikr. Bd. 17 p. 181.
— Eine neue Einbettungsmethode in Zelloidin. Ibid. p. 185.
Tschernischeff. Anfertigung mikroskopischer Präparate nach Stepanow. Ibid. Bd. 17 p. 479.
Weigert. Technik. Merkel-Bonnett. Ergebnisse der Anatomie und Entwickelungsgeschichte. III. 1893.
— Beiträge zur Kenntnis der normalen menschlichen Neuroglia. Frankfurt a. M. 1895.
— Zelloidinserienschnitte. Zeitschr. f. wiss. Mikr. II. 1895 p. 490.

III. Veränderungen des Gehirngewichtes nach Aufbewahrung desselben in verschiedenen Härtungsflüssigkeiten, speziell in Formollösungen.

Bei der makroskopischen Bearbeitung des Gehirns und Bestimmung des Gewichts desselben stösst man oft auf die Frage, wie sich das letztere nach kürzerem oder längerem Aufenthalt in den verschiedenen Konservierungsflüssigkeiten verändert.

Die Gehirne seltener Tiere werden oft aus fernen Ländern nach den anatomischen Instituten und Museen geschickt, nachdem das Anfangsgewicht der Organe an Ort und Stelle aus verschiedenen Gründen nicht festgestellt worden ist.

Die gleiche oben aufgeworfene Frage entsteht weiterhin, wenn man das in toto gewogene und aufbewahrte Gehirn später in einzelne Teile zerlegt und deren Spezialgewicht bestimmen will. Aus diesem Grunde hat E. Flatau den Einfluss der üblichen Konservierungsflüssigkeiten auf das Gehirngewicht studiert.

Da in der sehr sorgfältigen Arbeit Donaldsons die diesbezügliche Einwirkung der Chromsalze und des Alkohols für verschiedene Zeiträume mit grosser Exaktheit festgestellt wurde, so mögen

hier nur die Ergebnisse des Formols in verschieden prozentigen Lösungen angegeben werden und ein Vergleich mit den Wirkungen bei Chromsalzen und Alkohol, wie sie Donaldson erzielte, gezogen werden.

Es zeigte sich, dass das Gewicht des in 10prozentige Formolslösung gebrachten menschlichen Gehirns im ersten Monat um 2 bis 3 Prozent und nach ca. 5 resp. 15 Monaten nur um 1 Prozent des Anfangsgewichts zunimmt.

In 5prozent. Formollösung nimmt das Gehirngewicht in den ersten 4 Tagen um 9%, nach einem Monat um 10%, nach ca. 5 Monaten um 7%, nach ca. 15 Monaten um 6% zu.

In 1proz. Formollösung nimmt das Gehirngewicht in den ersten 2 Tagen um 14%, nach 1 Monat um 23%, nach 15 Monaten um 19% zu.

Die einzelne Hirnhemisphäre nimmt in 10proz. Formollösung in den ersten 3 Tagen um 7%, nach 1 Monat um 4%, nach ca. 19 Monaten um 2% zu.

Die einzelne Hirnhemisphäre nimmt in 1proz. Formollösung in den ersten 3 Tagen um 14%, nach 1 Monat um 20%, nach ca. 19 Monaten um 17% zu.

Das Rückenmark nimmt in 10proz. Formollösung in den ersten 3 Tagen um 10%, nach 50 Tagen um 14%, nach 19 Monaten um 14% zu.

Das Rückenmark nimmt in 1proz. Formollösung in den ersten 3 Tagen um 11%, nach 50 Tagen um 13%, nach 5 Monaten um 23%, nach 19 Monaten um 17% zu.

Hieraus ergiebt sich erstens, dass ein entgegengesetztes Verhalten des Prozentgehaltes der Lösung und der Zunahme des Gewichts besteht, dergestalt, dass je geringer die Konzentration der verwendeten Lösung, desto grösser die Gewichtszunahme ist.

Zweitens aber ergibt sich, dass die Gewichtszunahme in einer Kurve sich bewegt, deren Anfang und Ende ziemlich gleich hoch sind (in unsern Fällen während eines Spatiums von $1\frac{1}{2}$ Jahren) und deren Kulminationspunkt, wenigstens bei den schwächeren Lösungen, meist beträchtlich höher liegt.

Endlich erscheint die Gewichtszunahme des Rückenmarks weit beträchtlicher als die des Gehirns.

Kombinieren wir die Verhältnisse Donaldsons (für Chromsalze und Alkohol) mit den bei Formollösungen gewonnenen, so können wir folgende Übersichts-Tabelle für verschiedene Zeiträume aufstellen (bei den 24 Stunden p. m. der Leiche entnommenen Gehirnen):

Veränderungen des Gehirngewichtes bei Anwendung verschiedener Konservierungsflüssigkeiten.

Nach Tagen	**Abnahme** in Proz. durch **Alkohol** von 96 %	**Zunahme** in Proz. durch **Kal. bichrom**-Lösung von 2½ %	**Zunahme** in Proz. durch **Formol**-lösungen von		
			10 %	5 %	1 %
1	— 7 %	—	—	6 %	—
3	— 18 %	+ 21 %	+ 2 %	+ 9 %	+ 14 %
30	— 30 %	+ 32 %	+ 3 %	+ 10 %	+ 23 %
90	— 31 %	+ 32 %	+ 1,5 %	+ 9 %	+ 23 %
150	—	—	+ 1 %	+ 7 %	+ 22 %
450	—	—	+ 1 %	+ 6 %	+ 19 %
560	— 34 %	+ 31 %	—	—	—

Zeichenapparat nach L. Edinger.

Dieser Apparat ist speziell für das Zeichnen schwacher Vergrösserungen angegeben und beruht im Gegensatz zu den meistens gebrauchten Apparaten, welche das Prinzip der Camera lucida darstellen, auf dem Prinzip der objektiven Projektion, indem er Vergrösserungen von 2—30 direkt auf ein Blatt Zeichenpapier wirft, auf dem die Konturen mit dem Bleistift nachgefahren werden. — Es handelt sich um Lupenvergrösserungen und, nach Edinger, wirft eine Linse ihr Licht auf einen im Winkel von 45 Grad geneigten Spiegel, von wo das Licht abwärts auf den Objekttisch resp. das Präparat fällt. Unter dem Tisch befindet sich an einem Triebe verschiebbar ein Lupenhalter, zu welchem mehrere Lupen beigegeben werden. Das von der Lupe entworfene Bild fällt in voller Schärfe und Farbenpracht auf das horizontale Zeichenblatt.

Neben der Möglichkeit, auch ganz schwache Vergrösserungen zu zeichnen, bietet der Apparat den Vorteil, dass er den Zeichnenden auch bei lange fortgesetztem Arbeiten nicht ermüdet, weil das gleichzeitige Beobachten von Präparat und Zeichenstift, das die anderen Apparate verlangen, durch die objektive Projektion in Wegfall kommt.

Das Photographieren makroskopischer Präparate.

Nur kurz mag an dieser Stelle auch der Dienste gedacht werden, welche die Photographie für den Nervenanatomen geleistet hat und die ebenfalls für die Zukunft grössten Nutzen verspricht.

Zu unterscheiden sind hier ebenfalls Photographien makroskopischer und mikroskopischer Präparate.

Um eine naturgetreue Aufnahme der frischen makroskopischen Präparate zu machen, muss man dieselben in einer Lagerung photographieren, die am meisten der natürlichen im Körper entspricht.

Von diesem Gesichtspunkt ausgehend hat Flatau folgende Vorrichtung konstruiert, die eine „senkrechte Aufnahme" (speziell des Gehirns) ermöglicht und aus 3 Teilen besteht:

1) aus einem grossen runden Stativkopf aus Holz mit einem Loch für das Objektiv,
2) aus zwei Zwingerschrauben,
3) aus einem Metallrohr, in welchem ein Metallstäbchen aus- und eingeschoben und mit einer Schraube in jeder beliebigen Länge festgehalten werden kann.

Das frische Gehirn wird mit Wasser abgespült und möglichst in natürlicher Lage durch Kittsubstanz auf einem schwarzen Teller fixiert. Der Photographierende steht auf einem hohen Stuhl oder Tisch und stellt das Präparat, das am besten auf einem Drehstuhl liegt, ein.

Von besonderem Wert kann eine solche senkrechte Aufnahme z. B. bei Tumoren des Gehirns werden; in keinem anderen Organe ist es so wichtig, die genauesten Raumverhältnisse wiederzugeben, wie im Gehirn und Rückenmark, da ja die mannigfaltigsten Lokalisationsverhältnisse sich auf einen verhältnismässig kleinen Raum beschränken.

Zur Herstellung mikrophotographischer Aufnahmen bedient man sich des Apparats von Edinger (oder eines der anderen zahlreichen, verschieden konstruierten Apparate). Eine Beschreibung dieses Apparates erscheint mir an dieser Stelle überflüssig; er ist wohl jedem Interessenten genügend bekannt.

Literatur.

Donaldson, Preliminary observations on some changes caused in the nervous tissnes by reagents, commonly employed to harden them. Journ. of morpholog. Vol. IX. Boston 1894.

Edinger, Zeichenapparat. Zeitschr. f. wissensch. Mikr. VIII. 1894.

Flatau, Veränderungen des Hirngewichts in Formollösungen. Anat. Anz. 1897.
— Das Photographieren makroskopischer Präparate. Internat. med.-photogr. Monatsschrift. 1895.

Löwenthal, Handbuch der Färberei der Spinnfasern. 1895.

IV. Die Färbungsmethoden.

Seitdem jene Zeiten verstrichen sind, in denen es noch möglich war, an ungefärbten Präparaten, die der Anatom oder Pathologe mit dem von seiner Hand geführten Rasiermesser herstellte, bedeutende Entdeckungen zu machen, konnten weitere Fortschritte nur mittels stets fortschreitender Verbesserung und Verfeinerung der Untersuchungsmethoden erwartet und auch erzielt werden.

So ersetzte man allmählich die eigene Hand durch das Mikrotom, das Rasiermesser durch die plankonkaven grossen Mikrotommesser, und in dem Präparat selbst, dem man nun eine beinahe ideale Dünne, Gleichmässigkeit und Perspikuität geben konnte, machte man die verschiedenartigen in ihm enthaltenen Elemente durch „Färben“ sowohl different wie dem Auge besser erkennbar.

Während inzwischen die beiden erstgenannten Instrumente ebenso wie das Mikroskop eine Vollkommenheit erreicht haben, welche zu überbieten kaum noch möglich erscheint, befinden wir uns inbezug auf Entdeckung neuer Färbemethoden oder Verbesserung schon erfundener in einem steten Fortschreiten, das speziell in der neurologischen Mikroskopie die grössten Erfolge aufzuweisen hat und doch nur immer neue, höhere Ansprüche gebärt.

Einen guten Anhalt boten hierzu ja freilich die Ergebnisse, die die Chemie und die Färberei in gewerblicher Hinsicht aufwies, und hier wie in unserem Fache wird die Erzeugung bleibender Färbungen von charakteristischer Bedeutung intendiert.

Dass die Chemie mit ihren Riesenfortschritten hier von grösster Bedeutung wurde, weiss heute jeder, auch wenn es in so vielen Fällen bislang unmöglich ist, anzugeben, warum denn gerade dieses oder jenes Element sich anders als andere gegenüber einer Tinktion verhält.

Die meisten Färbungen sind empirisch entdeckt, ausgebildet aber doch erst oft durch viele weitere zielbewusste Forschungen und Experimente.

Wer sich über die Prinzipien der Färbung und ihrer Vorbedingungen im allgemeinen ausführlich unterrichten will, dem sei neben den zahlreichen meist trefflichen Lehrbüchern der mikroskopischen Technik das ausgezeichnete Handbuch der Färberei von Löwenthal empfohlen, im Speziellen jedoch bieten die vielen Arbeiten Carl Weigerts wahre Fundgruben auch in dieser Hinsicht.

Das, was wir anwenden in der Färbetechnik, um die Reaktionen hervorzurufen, sind Chemikalien, Beizen und Farbstoffe; streng

kann man freilich eine solche Einteilung nicht aufrecht erhalten, da z. B. das Kalium bichromicum ein wirklicher Farbstoff einerseits ist, der das Chromgelb erzeugt, andererseits aber in der Technik als Beize benutzt wird, abgesehen von seiner Wirkung des Härtens.

Während nun die Chemikalien allgemein nur gewisse vorbereitende und nachhelfende Wirkung ausüben, sind die Beizen dazu bestimmt, mit den Farbstoffen bestimmte gefärbte Verbindungen zu liefern und an der Bildung der schliesslichen Färbung teilzunehmen, indem sie tatsächlich Bestandteile der Farbe werden.

Sie liefern auf diese Weise die sogenannten Farblacke, und wenn sie manchmal nur als Befestigungsmittel der Farbstoffe dienen, so werden sie doch oft direkt wesentliche Bestandteile der schliesslichen Farbe, indem der Farbstoff ohne Beize keine eigentliche Färbung gibt; häufig liefert ja auch derselbe Farbstoff mit verschiedenen Beizen verschiedene Farbentöne mit verschiedenen Differenzen in ihrer Echtheit.

Der modernen Technik der Färbung von Präparaten ist nun in noch höherem Grade als der früher allein kultivierten der Vorwurf von vielen Pathologen gemacht worden, dass auf diese Weise eigentlich nur »Kunstprodukte« geliefert würden. Das ist in gewissem Sinne zweifellos richtig, und es wäre sicher die idealste Erfüllung unserer Wünsche, wenn es dereinst gelänge, all' die dauernden oder vorübergehenden Umwandlungsprozesse der Elemente, aus denen sich das Zentralnervensystem aufbaut, so wie sie wirklich sind, nicht wie wir sie künstlich mit Farben darstellen, vor unserem Auge vorüberziehen zu lassen.

Jeder Neurologe aber ist sich dessen bewusst, in gewissem Sinne Kunstprodukte unter dem Mikroskop zu erschauen. er ist sich jedoch zugleich bewusst, dass die fortschreitende Erkenntnis von Krankheitsprozessen und Lebensvorgängen zum grossen Teil erst der Arbeit von Männern zu danken ist, die wie Weigert, Golgi, Ehrlich u. a. der histologischen Forschung neue Wege wiesen.

Es ist hier nicht der Ort, diese Fragen ausführlicher zu behandeln; wohl aber ist es geboten, der Postulate zu gedenken, die Carl Weigert als Prinzipien einer guten Färbung aufgestellt hat.

Worin eine gute Färbung zu gipfeln hat, scheint leicht gesagt: es handelt sich einfach darum, dass bestimmte Gewebs- und Zellbestandteile einen Farbstoff einer Lösung an sich ziehen und damit eine möglichst intensiv gefärbte Verbindung von möglichst grosser Festigkeit bilden, mit anderen Worten: es handelt sich um das Deutlichermachen von Elementarbestandteilen mittels einer

bestimmten Farbe. Nun begnügen wir uns aber oft nicht damit, eine einzige Farbe in dem mikroskopischen Bilde unserem Auge darzubieten, wir verwenden Doppel-, ja Dreifachfärbungen, je nach bestimmten Absichten, die wir verfolgen.

Welches aber auch immer unsere Absicht sei, — als Richtschnur dürfen uns die Thesen gelten, welche Weigert[1]) formulierte, und die, wenn auch zunächst für eine Neurogliafärbung stipuliert, dennoch, mutatis mutandis, für jegliche Nervenfärbung ihre Gültigkeit haben.

1) Erstes Erfordernis ist, dass die Färbung eine **elektive** ist, d. h. dass sich nichts mitfärbt, was Anlass zu Verwechselungen gibt und was das deutliche Hervortreten der gewünschten Bestandteile hindert. — Für eine Neurogliafärbung z. B. ist nach Weigert jede Methode zu verwerfen, bei der eine Axenzylinder- und Nervenzellenfärbung nicht mit Sicherheit auszuschliessen ist.

2) Zweites wichtiges Erfordernis ist die Sicherheit der Methode, d. h.: jedes regelrecht hergestellte Präparat soll an jeder Stelle jeden einzelnen hier vorhandenen und darzustellenden Bestandteil zeigen. Unter allen Umständen wird man verlangen können, dass der Erfolg der Methode nicht auf der Schneide eines sehr kurzen Zeitabschnittes bei irgend einer der dabei vorkommenden Prozeduren steht; eine Färbung, bei der eine Sekunde mehr oder weniger über den Erfolg entscheidet, ist zu verwerfen.

3) Es ist sehr wünschenswert, auch andere Elemente, soweit es zur Orientierung nötig ist, erkennbar zu machen.

Handelt es sich z. B. um Darstellung von Neurogliafasern, so dürfen die Kerne sogar ohne jede Inkonvenienz in demselben Farbentone gefärbt sein, da ja kein Mensch eine Faser mit einem Kern verwechseln wird. Anderenfalls freilich wird es sich stets um eine Kontrastfärbung handeln müssen.

4) Die darzustellenden Elemente sollen eine möglichst grosse Prägnanz der Färbung aufweisen.

5) Die Vorbereitung und Herstellung des Präparates soll möglichst wenig Zeit erheischen, auch wenn im

[1]) C. Weigert: Beiträge zur Kenntnis der normalen menschlichen Neuroglia. 1895. Frankfurt a. M.

übrigen das »tuto« bei weitem dem »cito et jucunde« vorangeht.

Für die Markscheidenfärbung z. B. kann man jetzt ohne Anwendung von Wärme die Präparate schon in 4 Tagen vorbereiten (vergl. Markscheidenfärbung), während früher Wochen und Monate erforderlich waren.

6) Die mit den Präparaten vorzunehmenden Manipulationen dürfen diese nicht schädigen, so dass Schrumpfung, Brüchigkeit etc. vermieden bleiben.

7) Wünschenswert ist es, den Präparaten Dauerhaftigkeit zu verleihen.

Diese Postulate werden sich freilich nicht in allen Fällen gleichmässig erfüllen lassen, aber als vollkommen dürfte doch erst eine solche Methode betrachtet werden. welche, wie die klassische Markscheidenfärbung, allen jenen Anforderungen genügt. Eine elektive[1]) Darstellung der einzelnen Bestandteile wird der Pathologe jedenfalls zum mindesten verlangen; denn je isolierter die Färbung, desto leichter ist die Erkenntnis pathologischer Veränderungen.

Von diesem Standpunkt aus möge die Einteilung der Färbungsmethoden für die einzelnen Bestandteile des N.-S. gegeben sein, obwohl ja freilich nur in den wenigsten Fällen wie bei Weigerts und Nissls Methoden, eine absolut elektive Färbung vorhanden ist, und eben nur die betreffenden Elemente dargestellt werden.

Doch unterscheiden wir immerhin die Färbungen nach folgenden Gruppen:

A) Nervenzellen,
B) Markscheiden,
C) Axencylinder resp. Fibrillen,
D) Neuroglia.

Eine gesonderte Stellung mögen Golgis Methode und die vitale Färbung mit Methylenblau einnehmen.

---

[1]) Manche Autoren gebrauchen den Ausdruck „elektiv“ in anderem Sinne: sie sprechen von einer „elektiven“ Färbung bei der Golgischen Methode, weil nur einzelne Neurone (um diesen Begriff hier anatomisch zu verwenden) nicht alle sich darstellen lassen. Diese Deutung widerspricht nach unserer Auffassung dem Worte „elektiv“, welches nicht besagen soll, dass sich einzelne Zellen z. B., sondern nur Nervenzellen, nur Glia, nur Markscheiden oder nur Axenzylinder färben.

A. Die Färbung der Nervenzellen.

Diejenige Methode der Färbung, welche durch Gerlach 1854 mittels des Karmins überhaupt in die Technik eingeführt wurde, besteht in gewisser Beziehung noch heute; doch haben die verschiedenen Arten der Karmine so viel von ihrer Bedeutung in der neuesten Zeit verloren, dass manche Neuropathologen überhaupt kaum noch etwas von Karminfärbung wissen wollen. Aus verschiedenen Gründen! Das was uns Karminfärbungen zeigen, ist eventuell von einem geübten Auge bereits am ungefärbten Präparate zu sehen, resp. stellt sich auch bei anderen Methoden dar. Weiterhin scheinen die Karminpräparate jetzt gegenüber früheren Zeiten an Güte sehr nachgelassen zu haben und zumal die Benutzung von Alkohol vor der Färbung verhindert eine schöne Darstellung; aus diesem letzten Grunde kultivieren manche nur die Durchfärbung der ganzen, in Müllerscher Flüssigkeit gehärteten Stücke.

Immerhin ist es ratsam, auch die Karminfärbungen zu verwenden, da sie zur Erzielung eines Überblickes namentlich über pathologisch veränderte Nervenzellen nicht ganz ohne Bedeutung sind.

Die besten Färbungen erzielt man mittels Karmin [1]) dann, wenn die Alkoholbehandlung vermieden wird, wenn also das möglichst dünne Stück in toto nach der Härtung in die Farbflüssigkeit kommt. (Näheres unten.)

Färbung der Nervenzellen mittels Karmin und Haematoxylin.

Zum Durchfärben ganzer Stücke kommen das **Bealesche Ammoniak-Karmin**, das **karminsaure Natron** in 1 prozentiger Lösung, **Alaunkarmin** und **Borax-Karmin** in Betracht.

1. **Ammoniak-Karmin** (Beale).

Karmin	0,6
Liq. Ammon. caust. . . .	3,75.

Einige Minuten gekocht, dann wird hinzugesetzt:

Glyzerin	60,0
Aq. dest.	60,0
Alkohol	15,0.

[1]) Karmin wird durch Behandlung von Kochenilleauszug mit Alaun bereitet; das Pulver ist in Wasser und Alkohol fast unlöslich, leicht löslich in wässerigem Ammoniak.

Die Kochenille ist das getrocknete Weibchen des Coccus cacti, einer auf gewissen Kaktusarten lebenden Schildlaus; ihr färbender Bestandteil ist die Karminsäure.

Die ganzen Stücke bleiben 2—8 Tage in der Lösung, werden ausgewaschen, nachgehärtet in Alkohol, eingebettet und geschnitten. —

Der Vorteil besteht bei dem Durchfärben der ganzen Stücke, abgesehen von der Ersparnis an Zeit und Mühe, im Erzielen besserer Resultate infolge Vermeidens von Alkohol; die Färbung der kleinen Stücke, die nicht über 1 cm lang und nicht über 0,3 cm dick sein sollen, erfordert 2—4 Tage. Auswaschen, 24 Stunden in 100 ccm Alkohol (70 %) + 1 ccm Salzsäure, Entfernen der Säure durch Wasser. Danach Härten der durchgefärbten Stücke in Alkohol und Schneiden. Ein Nachteil des **karminsauren Natrons** ist sein hoher Preis (1 gr ca. 3 M.).

2. **Alaun-Karmin** nach Grenacher wird weniger gebraucht, sowohl für Durchfärbungen ganzer Stücke, wie für die einzelnen Schnitte. Die Herstellung geschieht so, dass 2—5 gr Karmin mit 100 ccm 5prozentiger Alaunlösung $^1/_4$—1 Stunde gekocht werden. Die Schnitte werden nach einem Aufenthalt von 10 Minuten bis zu einigen Stunden in der Farbe, in Aq. dest. ausgewaschen und dann einfach eingebettet. Eine Überfärbung ist nicht zu befürchten, andererseits eignet sich die Farblösung nicht für schwieriger färbbare Objekte wegen mangelnder Intensität der erzielten bläulichroten Färbung der Kerne; das Protoplasma ist hellrot, die Grundsubstanz fast gar nicht tingiert.

Nach Angabe von Upson vollzieht sich die Färbung der Schnitte bereits in 5 Minuten, wenn 1—3 Tropfen Phosphormolybdänsäure zu je 5 ccm der Alaunkarminlösung gesetzt werden.

Haug empfiehlt folgende Zusammensetzung:

Karmin	1,0
Borax	1,0
Alaunkarmin	2,0.

Diese werden verrieben und $^1/_2$ Stunde mit 100 ccm Liq. aluminis acetici gekocht; filtrieren. Die Lösung ist in wenigen Wochen brauchbar und lange haltbar.

3. a. **Borax-Karmin** (wässerige Lösung):

Karmin	0,5
Borax	2,0
Aq. dest.	100,0.

Mischen und bis zum Kochen erwärmen. Dann wird unter Umrühren Acid. acet. dilut. 5 ccm zugesetzt, bis die Farbe etwa der des Ammoniak-Karmins gleicht. — Nach 24 Stunden filtrieren.

b. **Borax-Karmin** (Grenacher) (alkoholische Lösung):

Karmin	2—3,0
Borax	4,0
Aq. dest.	93,0.

Nach 2tägigem Stehenlassen setzt man die gleiche Quantität Alkohol (70 %) hinzu. Filtrieren nach 36 Stunden.

Die Schnitte verweilen in einer dieser Lösungen 1/4 bis 10 Stunden. Überfärbung ist ausgeschlossen; differenziert wird wie oben in salzsaurem Alkohol; danach Wasser, Alkohol, Balsam.

c. **Neutrales Borax-Karmin** (Nikiforoff):

Carmin	3,0
Borax	5,0
Aq. dest.	100,0.

Kochen und Hinzusetzen von Ammoniak; wenn die Menge bis auf ihr halbes Volumen verdampft ist, wird etwa Acid. acet. dilut. hinzugesetzt; für Stückfärbung empfiehlt sich dieses Karmin besonders gut.

Der Vorgang der Färbung in Schnitten ist in allen Fällen der gleiche und einfache:

1. Härtung in Müller'scher Flüssigkeit.
2. Auswaschen in Wasser; Nachhärten in Alkohol; Äther-Alkohol, Einbetten in Zelloidin.
3. Schneiden; Färben in einer der Karminlösungen (wenige Minuten bis 24 Stunden).
4. Auswaschen in Wasser, resp. bei Verwendung der zusammengesetzten Karmine in salzsaurem Alkohol.
5. Alkohol, Öl oder Karbolxylol, Kanadabalsam.

Gefärbt werden leuchtend rot am besten die Nervenzellen mit Kernen, demnächst auch die Axenzylinder und die Gliasubstanz; Grundgewebe erscheint rosa, Markscheiden bleiben fast ungefärbt.

Pathologisch veränderte Zellen demonstrieren sich meist durch intensiven roten Farbenton, den man z. B. bei Rückenmarksquerschnitten oft schon makroskopisch mit blossem Auge deutlich erkennen kann.

Für die Karminfärbung von Zelloidinschnitten kommen folgende Arten in Betracht:

4. **Ammoniak-Karmin.** Es ist dasjenige Karmin, welches durch einen Zufall zuerst zur Färbung verwendet wurde. Herstellung: bestes französisches Karmin-Naccarat wird in beliebiger Quantität mit

etwas Ammoniak verrührt und sodann mit soviel Aqua dest. verdünnt, bis man eine dunkelrote Flüssigkeit erhält. Nach dem Filtrieren lasse man das überschüssige Ammoniak verdunsten; je älter, desto wirksamer wird die Lösung. Die Färbung selbst gelingt um so mehr, je länger man um so dünnere Lösungen von rosa-Farbe einwirken lässt, besonders in der Wärme. Hierbei ist auch der praktische Vorteil nicht zu übersehen, dass man die Schnitte deutlich in der Flüssigkeit erkennt, und das zeitraubende Suchen nach den Schnitten in einer dem Auge undurchdringlichen dunkelen Farbe wie bei den anderen Karminen fortfällt. Je länger die Fixierung und Härtung in Chrom gewährt hatte, desto längerer Zeit bedarf die Färbung; andererseits erinnert Schwalbe daran, dass manche Mängel der heutigen Karminfärbung durch vorheriges Einlegen der Zelloidinschnitte in Müller oder Chromsäure zu eliminieren sind. Dann ergibt die nachfolgende Ammoniakkarminfärbung dieselben Resultate, wie sie Gerlach schon erzielte: Doppelfärbung der roten Axenzylinder und der gelben Markscheiden. Nachdem die Färbung vollendet (12—24 Stunden), werden die Schnitte erst in Aqua, dann in Aqua mit etwas Essigsäure (etwa 1 %) abgespült; auch Salzsäure kann statt letzterer verwendet werden. Die Säure wird durch längeres Auswaschen in Aqua dest. entfernt (1—24 Stunden), und es erfolgt die übliche Weiterbehandlung und Einbettung in Balsam.

5. **Trockenes Ammoniak-Karmin** (Hoyer).

Man stellt sich eine wässerige Lösung her aus

Karmin	1,0.
Liq. ammon. fort.	2,0.
Aq. dest.	8,0.

Der Überschuss an Ammoniak wird durch Erhitzen entfernt, die Lösung nach ihrem Erkalten mit etwa 5 fachem Volum Alk. absol. vermischt. Nach dem Filtrieren lässt man durch Verdunsten das trockene Pulver sich bilden, das sich Monate lang hält. — Zum Färben stellt man sich dann eine etwa ½ prozentige wässerige Lösung her, die oft schon ganz frisch gute Resultate gewährt. Verstärkt wird die Färbekraft des Karmins durch vorheriges Beizen der Schnitte in 1 prozentiger Alaunlösung während einiger Minuten mit kurzem Abspülen im Wasser; doch scheint die Differenzierung dann manchmal zu leiden.

6. **Uran-Karmin** (Schmaus).

Karminsaures Natron 1 gr und Uranoxyd ½ gr werden mit einander verrieben und in 100 ccm Aq. dest. eine halbe Stunde gekocht.

Erkalten lassen, filtrieren. — Die Schnitte bleiben 15—20 Minuten in der Farbe, werden aber auch in 24 Stunden nicht überfärbt; das Zelloidin bleibt hier ungefärbt.

7. **Pikro-Karmin** (Ranvier):

Karmin	1,0.
Liq. Ammon. caust. . . .	3,0.
Aq. dest	10,0.

Nach erfolgter Lösung (in der Wärme) setzt man 200,0 gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung hinzu und dampft das ganze auf 1/3 seines Volumens ein. Filtrieren.

Die Schnitte kommen aus der Farbe nach 1 Stunde in 1 prozentiges Salzsäureglyzerin mit etwas Pikrinsäurezusatz, werden 5 Minuten in Wasser (ebenfalls mit Pikrinsäure) ausgewaschen, entwässert in Alkohol (desgl.) und eingebettet.

Auf diese Weise wird eine Art Doppelfärbung erzielt, die Kerne erscheinen braunrot, das Protoplasma gelb. Am wirksamsten färbt die Weigertsche Pikrokarminlösung von Dr. Grübler-Leipzig.

8. **Soda-Pikro-Karmin** (Loewenthal):

1 gr Natr. caust. wird in 100 ccm Aq. dest. gelöst, dazu kommt 0,4 Karmin; Kochen während 10—15 Minuten, und Verdünnen mit 100,0 Aq. dest. Hier giesst man nun soviel 1prozentige Lösung von Pikrinsäure hinzu, bis der Niederschlag gerade aufhört sich völlig zu lösen. Nach 3stündigem Stehenlassen wird mehrmals durch das gleiche Filter filtriert. Nach längerer Zeit tritt oft Trübung der Lösung ein.

Will man Dauerpräparate erhalten, so muss auch hier dem Wasser resp. Alkohol etwas Pikrinsäure zugesetzt werden.

Die Nervenzellen erscheinen in guten Präparaten rosa, die Kerne dunkelrot, Gliakerne hellrot, Axenzylinder etwas dunkler, Myelin gelb.

9. **Lithion-Karmin** (Orth):

Karmin	2,5—5,0
Gesättigte wässrige Lösung von Lith. carbon.	100,0.

Färbung ebenso wie bei Boraxkarmin. Die Kerne werden tiefrot tingiert; etwaige Überfärbung resp. Mitfärbung des Zelloidins ist durch Differenzieren leicht zu korrigieren.

10. **Pikro-Lithion-Karmin** (Orth):

Obige Lithion-Karminlösung	1 Teil
Gesättigte Pikrinsäurelösung	2 Teile.

Färben während 6—12 Stunden; im Übrigen wie oben, nur dass das Myelin gelb erscheint.

Für besonders schwer zu färbende Präparate empfiehlt Haug folgende Lösung, die sehr dauerhaft ist und sofort gebraucht werden kann.

Karmin	1,0
Ammon. Chlorat.	2,0.

Verreiben, Kochen in 100 ccm Aq. dest. — Nach dem Erkalten 15—20 Tropfen Liq. Ammon. caust. und 0,3—0,5 Lith. carbon. hinzufügen; filtrieren. Die Färbung der Schnitte erfolgt in wenigen Minuten; weitere Behandlung wie vorher.

11. **Alaun-Kochenille** (Csokor):

Je 1 gr Kochenille und Alaun werden zusammen verrieben, mit 100 ccm Aq. dest. auf die Häfte eingedampft, nach dem Erkalten filtriert; event. Zusatz von etwas Acid. carbol. gegen Schimmelbildung.

Auch hier ist Überfärben ausgeschlossen.

Die Zellkerne sind violett, Zellkörper und Axenzylinder rötlich gefärbt.

12. **Alkoholisches Salzsäure-Karmin** (P. Mayer).

4 gr Karmin werden in 15,0 Aq. dest. und 30 Tropfen HCl durch Kochen gelöst; dann fügt man 95,0 Alkohol (85 %) hinzu, filtriert heiss, neutralisiert mit NH_3, bis ein bleibender Niederschlag gerade entstehen will und filtriert nach dem Erkalten event. nochmals.

Färben für einige Minuten; auswaschen (80—90 %), dem etwas HCl zugesetzt wird, wenn man reine Kernfärbung erzielen wird.

H. Kadyi kam auf Grund von zahlreichen Experimenten zu dem Schluss, dass man nach vorheriger Formalinhärtung erst dann gute Karminfärbung erhält, wenn die Präparate vorher mit Metallsalzen gebeizt werden. Am geeignetsten erwiesen sich Cuprum aceticum, Uran. acet. und Plumb. acet. Die im Formol gehärteten Präparate wurden mit dem Gefriermikrotom geschnitten (also ohne Zelloidineinbettung), die Schnitte mit einem dieser Metalle gebeizt und dann in eine Lösung von karminsaurem Natron gebracht (aus der Breslauer Apotheke von Bloch). Die graue Substanz färbt sich dabei intensiver als die weisse, dann nimmt die weisse Substanz eine ebenso intensive Färbung an wie die graue. Bei weiterem Verweilen im Karmin fängt die graue Substanz wiederum an abzublassen, und dieselbe Erscheinung tritt dann auch an der weissen Substanz auf, so dass ein Moment eintreten kann, wo das graue Präparat fast farblos wird. Durch verschiedene Kombinationen (Dicke der Schnitte, Intensität der Karminlösung, Beizung u. a.) lassen sich verschiedene Färbungen der Präparate erzielen. Kadyi empfiehlt folgende Methoden: 1 Eine Methode, bei welcher ausschliesslich die graue Substanz gefärbt wird, während die weisse völlig ungefärbt bleibt. — Dies wird damit erreicht, dass die 0,1 mm dicken (und noch dickeren) Schnitte zunächst im Wasser abgespült werden und dann in eine Lösung aus 1 % Uran. acet. und 1 %

Acid. aceticum kommen. In dieser Flüssigkeit verbleiben die Schnitte, je nach ihrer Dicke, einige Stunden bis einige Tage, und werden dann mit 0,2—0,5 % karminsaurem Natron oder Ammoniak-Karmin gefärbt. Bereits nach einigen Sekunden tritt deutliche Verfärbung der grauen Substanz ein, wogegen die weisse Substanz ungefärbt bleibt. 2. Neurogliafärbung erhält man, indem die Schnitte vor der Beizung in Uran. acet. auf einige Zeit in eine Lösung von Kal. nitr. gebracht werden. 3. Eine intensive Färbung der weissen Substanz bei fast völligem Intaktbleiben der grauen erhielt Verf. in den Fällen, wo die Schnitte vor ihrer Beizung in Cupr. acet. einige Zeit in einer Lösung von Kal. nitr. verblieben. 4. Eine exklusive Färbung der Achsenzylinder erhielt K., indem die Schnitte zunächst sehr intensiv gefärbt waren und bei Entfärbung nur die Achsenzylinder die Farbe behielten. Dies lässt sich damit erreichen, dass a) die Rückenmarkstücke in neutraler oder alkalischer Formollösung gehärtet sein müssen (100,0 Aq. dest., 2,0 Natr. bicarbon. und 5,0 Formol), und b) die 1 proz. Lösung von Cupr. acet., welche zur Beizung dient, keine freie Essigsäure enthalten soll. Die in dieser letzteren Lösung gebeizten Schnitte werden in 2 proz. Kal. nitr. abgespült, dann intensiv in der oben angegebenen Farbenflüssigkeit tingiert und in einer Lösung differenziert, welche auf 100,0 Aq. dest., 1,0 karminsaures Natr. und 2,0 Kal. nitr. enthält. Nachdem die graue und z. T. auch die weisse Substanz blasser geworden sind, werden die Schnitte in 2 proz. Kal. nitr. abgespült und (nachdem keine Färbewolken mehr abgehen) in Alk. absol., Chloroform und Kanadabalsam gebracht.

Das **Hämatoxylin** ist von Waldeyer 1863 in die Technik eingeführt worden. Es wird heute zum Zweck der Darstellung der feineren Struktur der Kerne und des Zellleibs selbst angewandt. Speziell ist es in der von Flemming u. A. empfohlenen Sublimat-Eisenhämatoxylinfärbung (nach M. Heidenhain) event. Sublimatfixierung mit progressiv steigender Delafield-Hämatoxylin-Färbung für das Studium der Grundsubstanz bei den Nervenzellen zu empfehlen. Seine wertvollste Verwendung hat es jedoch in der Weigertschen Markscheidenmethode gefunden.

Hämatoxylin ist die färbende Substanz des Blauholzes. Chevreul fand in ihm (1810) einen gelblichweissen krystallinischen Körper, der sich schnell an der Luft, besonders in Gegenwart von Ammoniak, tief färbt. Durch Oxydation geht er in den eigentlichen Farbstoff des zubereiteten Blauholzes über, in das von Erdmann sogenannte Hämateïn. (C_{16} H_{12} O_6.)

Das Blauholz selbst ist vielleicht der wichtigste aller Farbstoffe; seine färbende Substanz ist zwar rot, gibt aber in Verbindung mit Beizen blaue, violette und schwarze Lacke. Das Blauholz (Campecheholz) ist nichts anderes als das von Rinde und Splint befreite Kernholz von Hämatoxylon campechianum (einer leguminosenartigen Cäsalpinie).

Die Hämatoxylin-Lösungen zersetzen sich nach einiger Zeit, mit Ausnahme der Ehrlichschen, die viele Jahre unverändert wirksam bleibt; im allgemeinen sind diese Lösungen am besten erst einige

Wochen nach ihrer Herstellung, d. h. nach ihrer »Reifung«, brauchbar. Im Gegensatz zu dem Karmin überfärbt das Hämatoxylin in seinen Lösungen sehr leicht (mit Ausnahme des Ehrlichschen, welches aber die Umrisse der Kerne nicht sehr scharf darstellt).

1. **Hämatoxylinalaun** (Boehmer):

Man halte sich vorrätig: a) eine Lösung von 1,0 Hämatoxylin in 10 ccm Alkoh. absol., b) eine 1 prozentige Alaunlösung.

Wenige Tage vor Gebrauch setzt man von a soviel zu b zu, dass die Farbe violett erscheint; in einigen Tagen ist die Lösung brauchbar, nachdem sie unter Lichteinwirkung noch nachgedunkelt ist. Überfärben der Lösung, wie es nach einigen Wochen oft eintritt, kann durch weitere Verdünnung mit b verhütet werden.

Färbung:

1. 1—3 Minuten in der stets zu filtrierenden Lösung.
2. Gründliches Auswaschen und Verweilen in Aq. dest. während 24 Stunden.
3. Alkohol, Origanum-Öl, Balsam.

Die Kerne sind blauviolett, das Protoplasma hellblau gefärbt.

Die Schnitte von Stücken, die in Chrom gehärtet waren, mögen erst ausgewaschen werden, bevor sie in die Farbe kommen; auch empfiehlt es sich, statt direkt aus dem Alkohol, erst nach kurzem Aufenthalt in Aq. dest. oder 1 prozentiger Alaunlösung die Schnitte zu färben.

Da die Schnitte im Wasser noch nachdunkeln, so lasse man sie nicht zu lange im Hämatoxylin; ist letzteres dennoch der Fall gewesen und trat Überfärbung ein, so lässt sich dieser abhelfen durch Anwendung von 1 prozentiger Alaunlösung mit nachfolgendem Auswaschen in Aq. dest.

Eine Behandlung mit Säure (manche verwenden Salzsäure 1 Tropfen auf 50,0 Aq. dest.) ist meist überflüssig; es müsste alsdann erst wieder ein Neutralisieren in Leitungswasser oder mit NH_3 z. B. stattfinden. Da Nelkenöl die Haltbarkeit der Hämatoxylinfärbung herabzusetzen scheint, verwende man lieber Origanumöl.

2. **Hämatoxylin** (Delafield):

2 gr Hämatoxylin, gelöst in 10 ccm Alc. abs. werden mit 200 ccm gesättigter Ammoniak-Alaunlösung gemengt, dem Licht in offener Flasche ausgesetzt, nach 4 Tagen filtriert. Dann werden je 100 ccm Alkohol und Glyzerin zugefügt; ist die Farbe dunkel geworden, so wird nochmals filtriert und die Flasche geschlossen; nach einigen Monaten ist die Lösung brauchbar in der Art, dass eine ge-

ringe Quantität davon zu einem Multiplum Wasser hinzugesetzt wird; im übrigen gelten dieselben Vorschriften wie bei 1.

3. **Säure-Hämatoxylin** (Ehrlich):

Hämatoxylin	6,0
Aq. dest. . . .	
Alcoh. absol. . .	$\overline{aa}$ 300,0
Glyzerin . . .	
Azid. acet-glac. . . .	20,0

Hierzu kommt noch Alaun im Überschuss. Man filtriert und setzt die Lösung 2—3 Wochen dem Licht aus, wodurch sie nachdunkelt.

Dieses Ehrlichsche Hämatoxylin zeichnet sich vor den anderen durch fast permanente Haltbarkeit aus, sowie durch schnelles Färben. Nach dem Färben Auswaschen in Wasser, woselbst der Schnitt wieder nachdunkelt, und einbetten.

Alle Kerne sind tiefblau. Zellkörper hellblau oder nicht gefärbt. Für schwer tingierbare Objekte empfiehlt Haug folgende Lösung, welche sehr schnell färbt:

Hämatoxylin	1,0
Alcoh. absol.	10,0
Liq. alumin. acet. . .	200,0.

Im Anfang blau, geht diese Farbe nach Wochen in eine schwarzbraune über; Zusatz von Lithion carbon befördert die Färbung. Eventuelle Differenzierung durch salzsauren Alkohol, auswaschen, einbetten.

4. Vielleicht das beste Kernfärbemittel ist das von Weigert neuerdings empfohlene, auch bei der Markscheidenfärbung jetzt zu verwendende **Eisenhämatoxylin;** dies letztere setzt sich zusammen aus zwei Stammlösungen a) und b):

a)	Liq. ferri sesquichlor. (officin.) . .	4,0
	Aq. dest.	96,0
b)	10proz. alkohol. Hämatoxylinlösung	10,0
	96proz. Alkohol	90,0,

die man vor dem Gebrauch im gleichen Verhältnis vermischt und in deren Mischung man die Schnitte verschieden lange Zeit belässt.

5. Auch zum Durchfärben ganzer Stücke eignet sich das Hämatoxylin und zwar in der von R. Heidenhain angegebenen Weise:

a) Färben in einfach wässriger, warm hergestellter, 0,5prozent. Hämatoxylinlösung (24—48 St.).

b) Direkte Übertragung in eine $^1/_3$prozentige wässrige Lösung

von einfach chromsaurem Kali (24—48 St.), mehrfaches Wechseln der Lösung, bis keine Farbwolken mehr abgehen.
c) Gründliches Auswaschen in Wasser.

Diese Heidenhainsche Methode hat Apáthy modifiziert, um den langen Aufenthalt des Objekts in der wässrigen Lösung abzukürzen. Daher verwendet er eine 0,5prozentige alkoholische Lösung von Hämatoxylin und ebenso eine alkoholische Lösung von doppelchromsaurem Kali (5prozent. wässrige Lösung von Kal. bichr. und doppelten Volum Alcoh. absol.).

Anschliessend an obige Kernfärbungen möge hier noch eine kurze Aufführung der **Anilinfarben** und ihrer Kombinationen folgen, welche gleichfalls als Kernfärbemittel zu betrachten sind.

Goodall hat mit diesen Mitteln ausführliche Prüfungen unternommen, und zwar sowohl an Stücken, die in Chromsalzen, wie an solchen, welche in Sublimat gehärtet waren (Nachbehandlung: Alkohol); aus seinen Untersuchungen ergab sich als allgemeine Regel, dass bei der Sublimatbehandlung eine schnellere Färbung erzielt wurde, als bei der Chromhärtung. Folgende **Anilinfärbungen** mögen hier ihren Platz finden.

1. **Anilin-Blue-black** (das englische Präparat). Lösung 0,25 : 100,0 Aq. dest. Färben $^1/_2$—1 Stunde. Man vermeide ein Überfärben, weil dann die Differenzierung resp. Extraktion des Überschusses an Farbe nicht genügend möglich ist. Auswaschen, Alkohol, Kresoot resp. ein Öl (cave: Nelkenöl, das die Färbung mit der Zeit verändert), Balsam.

Bei schwer färbbaren Objekten empfiehlt Goodall eine alkoholische Lösung ($^1/_6$—$^1/_3$ prozentig in Alc. absol.), welche schneller und intensiver wirkt, jedoch das Zelloidin weniger stark tingiert. Es werden dargestellt die Nervenzellen mit Kernen und Fortsätzen, Axenzylinder, Gliakerne und Gefässkerne und zwar blaugrau resp. tiefblau; am dunkelsten erscheinen die Nervenzellkerne und Axenzylinder.

Sublimat-Präparate fallen weniger gut aus als die mit Chrom vorbereiteten.

Modifikation von Bevan Lewis speziell für die Kleinhirnrinde:

Färben in der wässerigen Lösung, auswaschen, übertragen in eine 2 prozent. Chloralhydratlösung für 20—30 Minuten. Danach:

2 prozent. Chloralhydratlösung } $\overline{\text{aa}}$
Nelkenöl }

mit Zusatz von Alkohol. absol., bis eine klare Lösung erzielt ist; Differenzierung in dieser Mischung (am besten unter steter Kontrolle mittels schwacher Vergrösserung), dann Alkohol absol., Nelkenöl, Balsam.

Wie **Anilin-Blue black** wird auch **Indulin** gebraucht.

2. **Anilinblau** in stark wässeriger Lösung. Färbung 5 bis 10 Minuten, im übrigen wie oben.

Im Gegensatz zu den anderen Anilinen sind diese beiden Farben in Alkohol beständig. Auch hier ist Sublimatvorbehandlung nicht zu empfehlen. Wasserlösliches Anilinblau = Bley de Lyon (meist nach Verfärbung mit Karmin) in konzentrierter oder zur Hälfte mit Wasser-Lösung färbt das Protoplasma und die Axenzylinder schön himmelblau.

3. **Toluidinblau.** Lösung 0,25 : 100,0 Aq. dest. Zusatz von wenig Alkohol befördert die Lösung des Pulvers. Färben während 24—48 Stunden; bei Sublimathärtung in geringerer Zeit. Auswaschen, Alkohol (96 %), dann absoluter; sobald keine Wolken mehr abgehen, Xylol, Balsam.

Der Schnitt erscheint hellblau oder purpur; dunkelblau resp. purpurn sind die Kerne der Nervenzellen, der Glia, der Gefässe; Nervenzellen etwas heller. — Nach Chrombehandlung sind die Resultate angeblich weniger gut wegen zu diffuser Färbung.

4. **Viktoriablau.** Härtung in Sublimat; Färben in dunkelblauer Lösung für 48 Stunden; Behandlung wie oben. Resultate wie bei 3, nur entfärbt sich der Nervenzellkörper leichter. — Nach Chrombehandlung sind die Resultate weniger gut.

5. **Safranin.** Tiefrote wässerige Lösung (eventuell Wasser und Alkohol $\overline{aa}$). Färben während 12—24 Stunden; sonst wie oben. Zur Differenzierung empfiehlt sich manchmal salzsaurer Alkohol (wie bei Boraxkarmin) mit folgendem absoluten Alkohol. — Meist nach Fixierung in Chromosmiumessigsäure angewendet; Sublimathärtung nicht zu empfehlen.

6. **Dahlia.** Tiefrote wässerige Lösung. Färben bis 48 Stunden. Überfärben wie bei Toluidinblau korrigiert; bei Sublimat und Chrom gleiche Resultate.

7. **Gentianaviolett.** Dunkelviolette wässrige Lösung. Färbung bis 48 Stunden, dann wie vorher; eventuell salzsaurer Alkohol; bei Sublimat und Chrom gleiche Resultate.

8. **Methylviolett.** Dunkelviolette Lösung in Alkohol und Wasser zu gleichen Teilen; Färben 2—3 Tage; wie oben. Sublimat gibt bessere Resultate als Chrom.

9. **Methylenblau.** Tiefblaue wässrige Lösung. Färben 48 Stunden, wie oben. — Besonders für Gliakerne geeignet. — Bei Sublimat und Chrom gleiche Resultate.

10. **Kongorot.** Tiefrote Lösung in Alkohol und Wasser in gleichen Teilen. — Färben 12—18 Stunden; die rotbraunen Schnitte werden in Wasser und Alkohol ausgewaschen, dann einige Stunden in salzsaurem Alkohol (wie bei Boraxkarmin) differenziert: Wasser, Alkohol (kurze Anwendung), Xylol, Balsam. — Axenzylinder erscheinen schwarzbraun, Nerven und Gliazellen ebenso oder purpur, Grundsubstanz heller; die Axenzylinder erscheinen besonders deutlich.

Nissl empfiehlt folgenden Modus:

Härtung in Kal. bichrom., Alkohol (95 %), Färben in Kongorotlösung (5,0 : 400,0) 72 Stunden.

Alkohol (95 %) 5—10 Minuten, Salpetersäure-Alkohol (3,0 : 100,0) 6 Stunden, Alkohol, Öl, Balsam.

Sublimathärtung nicht zu empfehlen.

11. **Methylgrün.** Kommt weniger in Betracht, da es sehr schnell in Alkohol und Wasser ausgezogen wird.

Erlitzky wandte es aber viel an bei Stücken, die mit seiner Flüssigkeit gehärtet waren, und zwar in 1,5 bis 2proz. alkoholischer oder wässriger Lösung. Färben 12—24 Stunden.

Als Kernfärbung von Wert: man setze zu einer starken wässrigen Farblösung noch 1 % Essigsäure hinzu und wasche in leicht angesäuertem Wasser die Schnitte aus.

Von den überaus zahlreichen **Anilinkombinationen** seien (nach Goodall) folgende wichtige hervorgehoben:

1. **Biondi - Ehrlichs** Dreifarbgemisch (Methylgrün, Säurefuchsin, Orange).

Sublimathärtung resp. Chromhärtung, Färben 6—24 Stunden, Auswaschen, Alkohol, Xylol, Balsam.

Der Schnitt erscheint rötlich, die Nervenzellen hellviolett, ihre Kerne dunkelviolett, Gliakerne blau-grünlich, Gefässe dunkelrot.

2. **Gentiana-Violett und Eosin:**

Chromhärtung, Färben in alkoholischer Gentiana-Violettlösung (zur Hälfte mit Wasser verdünnt), Alkohol resp. salzsaurer Alkohol zur völligen Differenzierung, Färben für 1—2 Minuten in ziemlich starker wässeriger Eosinlösung, kurzes Entwässern in Alkohol, Xylol, Balsam.

Speziell zur Erzielung von Kontrastfärbungen sind eine Reihe von Kombinationen im Gebrauch, die auch nicht übergangen werden dürfen, obwohl viele derselben für den eigentlichen Zweck der Untersuchung: die Kenntnis vom Bau zu fördern und pathologische Ver-

änderungen darzustellen, ohne wesentliche Bedeutung sind. Die Technik ist bei ihrer Anwendung meist einfach und bezieht sich durchwegs auf die übliche Vorbehandlung der Stücke mittels doppeltchromsaurem Kali und Nachhärtung in Alkohol.

1. **Hämatoxylin und Pikrinsäure:**

Färben in Hämatoxylin (z. B. Ehrlichs) $^1/_4$ Stunde; Auswaschen, Alkohol, der durch Pikrinsäure-Krystalle gelb gefärbt ist (einige Minuten); der blaue Schnitt wird gelblich; Xylol, Balsam.

Nervenzellen erscheinen gelblich, ihre Kerne hellviolett, Gliakerne und Gefässkerne dunkelviolett, Grundsubstanz gelb.

2. **Karmin und Pikrinsäure:**

Färben in Karmin; Weiterbehandlung wie bei 1.; der rote Schnitt wird gelbrötlich; Xylol, Balsam.

Nervenzellen erscheinen rot, der Kern am tiefsten rot, Grundsubstanz heller. — Gliakerne nicht deutlich.

3. **Hämatoxylin und Eosin:**

Färben in Hämatoxylin (Ehrlich) $^1/_4$ Stunde; Auswaschen; Gegenfärben in schwacher wässeriger Eosinlösung (einige Minuten); der blaue Schnitt wird violett-rötlich. — Xylol, Balsam.

Nervenzellen rot, ihre Kerne hellviolett, Glia- und Gefässkerne dunkelviolett, Grundsubstanz hellrot.

Diese Kombination liefert die besten Bilder, ist daher auch mit am gebräuchlichsten; Goodall empfiehlt jedoch auch die folgende als sehr gut:

4. **Hämatoxylin und Benzo-Purpurin B.:**

Färben in Hämatoxylin (Ehrlich) 10 Minuten; Auswaschen; Gegenfärben in schwacher wässeriger Benzo-Purpurin-B.-Lösung (einige Minuten); Auswaschen; Alkohol, Xylol, Balsam.

Nervenzellen rötlich, ihre Kerne hellviolett, Glia- und Gefässkerne dunkelviolett, Grundsubstanz rötlich-violett.

5. **Hämatoxylin und Anilin Blue-black:**

Färben in Hämatoxylin, einige Minuten; dann in einer 0,5 prozentigen wässerigen Anilin-Blue-black-Lösung einige Sekunden, auswaschen und wie oben.

Abgesehen von der Schnelligkeit der Tinktion bei dieser Kombinierung tritt der Kontrast deshalb so gut hervor, weil Anilin-Blue-black hauptsächlich die Nervenzellen, das Hämatoxylin besonders die Gliazellen darstellt. Besonders erscheint diese Färbung für die Kleinhirnrinde (Purkinjesche Zellen) geeignet.

6. **Hämatoxylin und Safranin:**

Färben in Hämatoxylin (wenige Minuten); Auswaschen; Gegenfärben in Safraninlösung (Safranin 1,0, Alkoh. absol. 100,0, Aq. dest. 200,0); Auswaschen und wie oben. —

Nervenzellen und Axenzylinder hellroth, alle Kerne violett, Grundsubstanz rötlich.

7. **Anilin-Blue-black und Pikrokarmin:**

Färben in Pikrokarmin ($^1/_4$—$^1/_2$ Stunde); dann direkt Gegenfärben in $^1/_4$ prozentiger wässeriger Anilin-Blue-black-Lösung. Nach etwa 10 Minuten erscheint der Schnitt dunkelviolett. — Weiterbehandlung wie oben.

Besonders scharf erscheinen inmitten der violett gefärbten Gebilde die Gefässkerne.

8. **Pikrokarmin und Anilingrün:**

Färben in Pikrokarmin ($^1/_4$—$^1/_2$ Stunde im Brutofen); Auswaschen in angesäuertem, dann schnell in destilliertem Wasser. Gegenfärben in wässeriger Anilingrünlösung (1,0 : 1000,0) (24 Stunden). Wasser, und wie oben.

Besonders empfohlen für Erkennung der Struktur des Kleinhirns bei schwacher Vergrösserung. Parkinjesche Zellen und Gefässe erscheinen rot. Axenzylinder dunkelgrün, Myelin hellgrün.

9. **Karmin und Anilinblau** (Duval).

Färben in Karmin, Auswaschen, Gegenfärben für 5 Minuten in folgender Lösung:

Gesättigte alkoholische Anilinblaulösung 10 gtt.
Alkoh. absol. . . . . 10,0.

Aufhellen in Terpentin, ohne weitere Anwendung von Alkohol, Balsam.

Die Schnitte erscheinen dunkelviolett; Nervenzellen mit Axenzylindern rötlichviolett, Gliakerne blau, Gefässe blauviolett.

10. **Boraxkarmin und Pikrokarmin.**

Färben nach Belieben zuerst in dem einen oder anderen Stoff, oder auch in einer Mischung beider (einige Tropfen Pikrokarmin zu einem Wasserglas Boraxkarmin zugesetzt). Auswaschen, Entwässern in Alkohol mit Pikrinsäurezusatz, Xylol, Balsam.

Resultate im Allgemeinen wie bei 2 (Karmin und Pikrinsäure), doch sind die Kerne schärfer hervortretend.

11. Boraxkarmin und Indigokarmin.

Färben in Grenachers Boraxkarmin (einige Stunden), differenzieren in salzsaurem Alkohol, Auswaschen, Gegenfärben in dunkelblauer alkoholischer Indigokarminlösung (10—20 Stunden). Auswaschen, Alkohol, Xylol, Balsam.

Die Nervenzellen erscheinen blau, ihre Kerne rot, Glia sowie Gefässkerne rot resp. violett; Grundsubstanz blaugrün, Mark grün.

Die Nervenzellenfärbung nach Nissl.

1) Härtung des frischen Materials in 96 prozentigem Alkohol (16—24 Stunden).
2) Aufkleben der Stücke (ohne Einbettung) auf Kork mit Fischleim oder Gummi arabikum. Schneiden.
3) Färben mit Methylenblaulösung in einem Uhrschälchen über der Spiritusflamme, bis (bei 65—70° C.) Bläschen abgehen. Die Farblösung besteht aus:

Methylenblau B. pat. . .	3,75
Venetian. geschabte Seife .	1,75
Aq. dest.	1000,0.

4) Differenzieren in Anilinölalkohol, bis keine gröberen Farbwolken mehr abgehen:

Anilinöl	10,0.
Alkohol (96%).	90,0.

Das Anilinöl wie die Differenzierungsflüssigkeit ist in dunkler Flasche vor Licht zu schützen.

5) Die Schnitte werden auf dem Objektträger gründlichst abgetrocknet, dann mit Oleum Cajeputi durchsichtig gemacht. Wiederum abtrocknen mit Fliesspapier.
6) Übergiessen mit Benzin und Einbetten in Benzinkolophonium, wobei die Benzingase durch Erhitzen über der Flamme ausgetrieben werden. —

Für die Untersuchungen der Nervenzellen nach der Nisslschen Methode möge eine Reihe von Anweisungen beachtet werden, welche Goldscheider und Flatau[1]) gegeben haben.

1) Das Rückenmark in toto (resp. nur 2 cm lange Stücke) kommt auf 5—10 Minuten in Alkohol; auf den Boden des Gefässes ist Watte vorher zu legen.

[1]) Goldscheider u. Flatau. Normale und pathologische Anatomie der Nervenzellen. — 1898.

2) Nach 5—10 Minuten werden 2—3 mm dünne Schnitte angefertigt, deren eine Fläche (nach Belieben die proximale oder distale) nach vorherigem Abtrocknen mit Fliesspapier mit einem Tintenpunkt in der weissen Substanz markiert wird. Für die ganz dünnen Stücke genügt bereits eine Härtung von 15—20 Stunden.
3) Abziehen der Pia mit feiner Pinzette am sulcus longitudinalis beginnend. Die Stückchen werden auf Fliesspapier abgetrocknet und auf Kork mit ganz dünner Fischleimschicht befestigt (unter leichtem Andrücken des Fingers). Betupfen mit Alkohol (96 %).
4) Korken und Stücke kommen in Alkohol (96 %); nach ½ Stunde kann man bereits schneiden; am besten nicht später als 1—2 Stunden danach. Nach einigen Tagen Aufenthalt in Alkohol verlieren sie ihre Schnitt- und auch Färbungsfähigkeit.
5) Die Schnitte (10—20 μ) werden in Methylenblau übertragen; das Entstehen von Bläschenbildung ist nicht nötig, eine leichte Erwärmung bis Dampfentwicklung genügt, und die Schnitte bleiben dabei an der Oberfläche.
6) Die Schnitte kommen auf ½—1 Minute in Anilinölalkohol, dann nochmals in Methylenblau (doppelte Färbung) und wieder in Alinilinalkohol; die weisse Substanz muss hell erscheinen. — Es empfiehlt sich, die Schnitte vor der Färbung erst einige Stunden in Alkohol zu lassen.
7) Die Schnitte passieren mehrere Schalen Anilinölalkohol, werden dann auf dem Objektträger mit feinem Fliesspapier (mehrfache Lage) sehr stark (wegen der grösseren Haltbarkeit) getrocknet, sie nehmen dann einen Perlmutterglanz an.
8) Kurz Kajeputöl, schnell abtrocknen, Benzin und Benzinkolophonium.

Später im Präparate auftretende Krystalle sind durch Erwärmen zu beseitigen. Statt direkt in Alkohol dürfen die Stücke anfangs auch erst 1—2 Tage in 10—20 prozentigem Formol fixiert werden.

Modifikation der Nisslschen Methode nach Sadorsky (mit Formolanwendung).

1) Härten in Formol (10 %) 3—4 Tage.
2) Alkohol (96 %) 2 Tage; Alkohol absol. 3 Tage; Zelloidin.
3) Färben in Methylenblaulösung (1 %) oder in Fuchsin — 5 prozentiger Karbolsäurelösung (gesättigt).

4) Differenzieren mit 1 prozentiger Eisessiglösung, bis graue und weisse Substanz sich von einander abheben.

5) Alkohol. absol. Xylol, Balsam.

Nissls Färbung, die Thionin- und Toluidinblaufärbung dienen zur Darstellung der färbbaren geformten Substanz (Nissls Zellkörperchen).

Flemmings und Helds Methoden[1]) färben auch die Zwischensubstanz resp. die Grundsubstanz.

Flemming benutzte die Chromsäure, Chromessigsäure und besonders konzentrierte Sublimatlösung bei der Fixierung; von Färbungen wandte er ausser Safranin und Gentianaviolett besonders Heidenhains Eisenhämatoxylin, ferner Sublimatpräparate mit progressiver (Delafields) Hämatoxylinfärbung an.

Um die Kunstprodukte bei der Deutung der Befunde möglichst auszuschalten, hat Nissl z. B. den Ausweg angewandt, dass er an die Stelle der im Gewebe vorkommenden Nervenzellen das Äquivalent der Zellen setzt, worunter das mikroskopische Bild der im Gewebe vorhandenen Nervenzellen des in einer bestimmten Weise getöteten Tieres zu verstehen ist, das sich bei einer bestimmten Behandlung unter bestimmten Voraussetzungen erfahrungsgemäss mit einer gesetzmässigen Konstanz ergibt. Die wenigen vom Äquivalentbild abweichenden Formen, die auf noch nicht erkannte Einflüsse der Technik zurückzuführen sind, bleiben dabei unberücksichtigt, werden gewissermassen ausgeschaltet. Infolge dessen ist auch die Frage nach dem Vorhandensein von Kunstprodukten gegenstandslos; denn wenn alle Nervenzellenbilder Äquivalentbilder sind, so ist es klar, dass jede Abweichung vom Äquivalente nur in der Zelle selbst ihre Ursache finden kann.

Von den Auseinandersetzungen und Angaben, die Nissl selbst macht[2]), seien einige wenige hier noch angeführt: Da die Herstellung der Äquivalentpräparate vollkommen gleiche Verhältnisse (Alter, Art der Tötung, Einhalten gleicher Zeitintervalle von der Tötung bis zur Sektion etc.) voraussetzt, so gibt es nur Äquivalentpräparate tierischer Nervenzellen; bei Menschen kann man daher nicht von Äquivalentpräparaten, wohl aber von Äquivalentbildern reden, und durch eingehende vergleichende Studien der tierischen Äquivalentpräparate mit Präparaten des menschlichen Nervensystems (bei Anwendung gleicher Methodik) diejenigen mikroskopischen Bilder von menschlichen Nervenzellen ableiten, die den Nervenzellenäquivalenten des tierischen Nervensystems entsprechen. Der Unterschied zwischen dem Äquivalentbilde des Tieres und des Menschen besteht also darin, dass ersteres sich direkt im Mikroskop als solches präsentiert, während letzteres erst erschlossen werden muss. — Die Gewebsblöcke können (allerdings nicht im aufgeklebten Zustand!) lange aufbewahrt werden, während die einmal fertiggestellten Schnitte auffallend empfindlich sind, und man daher gut tut, nur so viele zu schneiden, als man gerade zu

[1]) Vgl. pag. 70.

[2]) Encyclop. der Mikr. Technik p. 988 ff.

färben gedenkt. Die Farblösung schüttele man stets vor dem Gebrauch und filtriere sie, wie man auch nur mit mindestens 3 Monate alten Lösungen arbeite. Massgebend für die Tinktion ist ferner der Gesichtspunkt einer möglichst gleichmässigen Behandlung der Schnitte: gleiche Apparate, gleich grosse Gefässe, gleiches Quantum Flüssigkeit. Regelrecht hergestellte Schnitte halten sich bei Schutz vor Sonnenlicht mindestens 3—5 Monate; ein Schnitt mit Zeichen von Abblassung ist kein Äquivalentpräparat mehr. Die bis jetzt bekannten, sicher wirkenden Faktoren der Abblassung der Äquivalentpräparate sind:

1) Einfluss des Sonnenlichts,
2) Einfluss von Spuren von Anilinöl und Kajeputöl, die im Schnitt zurückgeblieben sind,
3) Einfluss eines weichen, halbflüssigen Einbettungsmediums.

Will man die Stücke einbetten, so ist Zelloidin dem Paraffin vorzuziehen; man gebrauche aber nur tadelloses Zelloidin und härte vorschriftsmässig in 96 prozentigem Alkohol, dann in absolutem Alkohol, und bette (mit Vermeidung von Äther-Alkohol) möglichst schnell ein. Zum Aufbewahren dieser Blöcke ist Holz und Kork zu meiden und nur Stabilit zu nehmen. Eine Formolfixation ist unter Umständen wohl zulässig und brauchbar, nur darf man nicht erwarten, dass dabei gleichzeitig die verschiedensten Elemente des Nervensystems in gleich vorzüglicher Weise mikroskopisch sichtbar zu machen sind. Ebenso betont Nissl, dass Doppelfärbungen wohl dem Histologen nützlicher als dem Histopathologen seien, und letzterer sich jedenfalls mit solchen Doppelfärbungen nicht begnügen dürfe.

Nicht dargestellt werden im Äquivalentpräparat die Nervenfasern und das nervöse Grau, ferner die Neurofibrillen und Golginetze.

Nissls ältere Methode der Nervenzellenfärbung.

1) Härtung in Alkohol von 96 %.
2) Schneiden; Färben über der Flamme in konzentrierter wässeriger Fuchsin- oder Magentalösung, bis Dampfwolken aufsteigen.
3) Auswaschen 1—2 Minuten in Alkoh. absol.
4) Nelkenöl, Kanadabalsam.

Die Möglichkeit, von Stücken, welche für Nissls Färbung bestimmt sind, auch Schnitte zur Markscheidenfärbung (Weigert-Pal) zu verwenden, ist gegeben, sobald eine Vorhärtung mit Formol stattgefunden hatte. Man verfährt dann nach H. Gudden so, dass die Schnitte auf ca. 10 Stunden bei Zimmertemperatur in 0,55 prozentige Chromsäure gelegt werden. Nach Abspülen in Wasser und kurzem Durchtränken in 80 prozentigem Alkohol verhalten sich die Schnitte wie Präparate, welche die Härtung in Müllerscher Flüssigkeit durchgemacht haben, ja die Färbung wird, wenn man dem Haematoxylin einige Tropfen verdünnter Salpetersäure hinzusetzt, noch eine viel bessere (vergl. auch Marina).

Die Nervenzellenfärbung mit Thionin. [1])
(Weigert-Hoyer.)

Für Präparate, die in Alkohol gehärtet sind (wie bei Nissls Methode), möge noch die sehr brauchbare Färbung der Nisslschen Körper mit Thionin erwähnt werden:

1) Härten in Alkohol (96 % resp. absolut.) eventuell mit 2 tägiger Vorbehandlung mit 50 prozentiger Formollösung.
2) Einbetten in Zelloidin (oder in Paraffin, zur Erzielung feinster Schnitte).
3) Färben in konzentrierter wässeriger Thioninlösung, 5 Minuten.
4) Schnelles Abspülen; differenzieren in: Anilinöl 1,0, Alkoh. absol. 9,0.
5) Aufhellen in Ol. cajeputi, Xylol. Xylol-Kanadabalsam.

Wie bei der Nisslschen Färbung, so ist auch hier die Haltbarkeit eine begrenzte und oft schnell vergängliche.

Die Nervenzellenfärbung mit Toluidinblau
(v. Lenhossék, Hoyer).

1) Fixieren in konzentrierter Sublimatlösung (24 Stunden).
2) Härten in Alkohol steigender Konzentration.
3) Vorsichtiges Einbetten in Paraffin (mit Chloroformbenutzung).
4) Schneiden (5 μ), Aufkleben der Schnitte mit Aqua destillata (Gullands Methode) Extrahieren des Paraffins mit Xylol und Jodalkohol.
5) Färben mit konzentrierter wässeriger Toluidinblaulösung (mehrere Stunden).
6) Differenzieren in Anilin-Alkohol, Nachfärben in alkoholischer Eosinlösung (resp. Erythrosin).
7) Schnelle Entwässerung mit Alkoh. absol., Xylol, Xylolkanadabalsam.

---

[1]) Das Thionin (Lauthsches Violett, ein basischer Teerfarbstoff), ist chemisch dem Methylenblau (Tetramethylthioninchlorid) nahe verwandt, es bildet dessen Muttersubstanz; beide Stoffe sind Indamine. Zur Thioningruppe gehört auch das Toluidinblau. (Dimethyltoluthionin). Verwendet wurde das Thionin zum ersten Male von P. Ehrlich zur Färbung der lebenden Nervensubstanz (ebenso wie das Methylenblau). Ein Unterschied zwischen beiden Körpern besteht darin, dass das Methylenblau leichter in Wasser löslich ist und ein stärkeres Färbevermögen hat. Während aber Thionin ein sehr reiner Kernfarbstoff ist, tritt beim Methylenblau im allgemeinen leichter eine Überfärbung ein, so dass ausser den Kernen auch das Protoplasma sich ziemlich stark mit ihm imbibiert.

Bei dieser Färbung werden die Nisslschen Körperchen intensiv dunkelblau gefärbt; die Grundsubstanz ist nach der Alkoholdifferenzierung fast farblos und wird mit Eosin tingiert.

Zu beachten ist bei dieser Methode besonders, dass die Schnitte beim Wechsel der Flüssigkeiten nie eintrocknen dürfen, da sonst leicht Zerstörungen an den Zellen stattfinden; bei der ganzen Nachbehandlung ist also Filtrierpapier zu vermeiden. Eine dauernde Haltbarkeit bieten die schönen Präparate jedoch nicht dar.

Polumordwinow empfiehlt Fixation in Carnoy-Gehuchtens Flüssigkeit und Paraffineinbettung, sowie Färbung in alkalischer Toluidinblaulösung (1 ccm 1 prozentiger Farblösung auf 119 aq. dest. + 1 g Natr. bicarbon.) während 24 Stunden. Differenzieren in 96 prozentigem Alkohol (2—15 Minuten), Ol. origan., Damarlack. Die Präparate sind sehr haltbar.

Nach Hoyer und v. Lenhossék ist das Toluidinblau geradezu ein Spezifikum für die Nisslschen Körperchen, in noch höherem Grade als Thionin oder Methylenblau. Auch ist die Methode mit besonderem Vorteil für die Zellen der Spinalganglien zu verwenden.

Die Nervenzellenfärbung mit Cresylviolett RR.
(Bielschowsky-Plien.)

1) Härten in Formol oder Alkohol.
2) Zelloidin- oder Paraffineinbettung. Schneiden.
3) Färben (24 Std.) in dünner, wässeriger Cresylviolett RR.-Lösung. (6—10 gtt. einer konzentrierten wässerigen Lösung auf 50,0 Wasser.)
4) Rasches Durchziehen der Schnitte durch Wasser; Entwässern in Alkohol steigender Konzentration, wobei graue und weisse Substanz sich differenzieren.
5) Kajeputöl, Xylol, Balsam.

Überfärbte Schnitte werden durch längeres Verweilen in Alkohol differenziert.

Auch diese Färbung gibt ganz ausgezeichnete Resultate; die Haltbarkeit der Präparate ist sogar noch grösser als bei Thionin oder Toluidinblau uud der Verbrauch an Farbe geringer, da dünne durchsichtige Lösungen benutzt werden können.

Zur Darstellung der Nisslschen Granula eignet sich ferner auch die

Eisenhämatoxylinfärbung nach M. Heidenhain.

1) Fixieren in Sublimat (Alkohol, Formol oder Carnoy-Gehuchten).

2) Schneiden; Aufkleben der Schnitte mit Aq. dest., Vorfärben mit Bordeaux-R.
3) Beizen in $2^1/_2$ prozentiger Lösung von schwefelsaurem Eisenoxydammonium (violettes Eisenalaun) 3—12 Stunden. Der Objektträger steht senkrecht in der Lösung, damit keine Niederschläge von Eisenoxyd auf den Schnitt fallen.
4) Abspülen in Aq. dest.
5) Färben (12—36 Stunden) in 4—6 Wochen alter, zur Hälfte verdünnter Weigertscher Hämatoxylinlösung. (Frische Lösung wird nur durch Zusatz von etwas Beize brauchbar.)
6) Abspülen in Leitungswasser.
7) Langsames Differenzieren in obiger Beize von Eisenoxydammonium unter Kontrolle des Mikroskops bei Wasserimmersion, bis das Protoplasma entfärbt ist; danach $^1/_4$ Stunde in fliessendem Wasser.
8) Alkohol, Xylol (cave: Äther. Öle!) Kanadabalsam.

Statt vorzufärben, kann man auch mit Bordeaux-R., Eosin oder Erythrosin nachfärben.

Von Rosin ist auch das Neutralrot zur Darstellung der Nisslschen Granula benutzt worden:

1) Formolfixation, Zelloidineinbettung.
2) Schnitte bleiben $^1/_2$ Stunde in konzentrierter wässeriger Neutralrot-Lösung, werden in Wasser ausgewaschen.
3) Alkohol, Xylol, Kanadabalsam.

Die Granula erscheinen leuchtend rot, Zelleib schwach gelblich.

J. Arnold gelang es, an der Zunge des lebenden curarisierten Frosches prachtvolle Granulierung zu erhalten, indem er dieselbe mit Neutralrotkörnchen bestäubte.

Für die Erkennung der Struktur der Nervenzellen und ihrer Fortsätze hat Held noch eine Doppelfärbung angegeben, welche sehr schöne Bilder liefert und hier nicht übergangen werden mag; sie sucht speziell die zwischen den sogenannten Nisslschen Körpern befindliche, sonst ungefärbt bleibende Protoplasma-Masse darzustellen.

Die Modifikation der Nissl'schen Methode nach Held.

1) Paraffineinbettung; die Schnitte (1—10 μ dick) werden mit dünnem Alkohol aufgeklebt.
2) Färben mit folgender Erythrosinlösung:

Erythrosin. pur.	1,0
Aq. dest.	150,0
Eisessig	2 gtt.

(1—2 Minuten unter leichtem Erwärmen.)

3) Abwaschen in Wasser; Nachfärben mit folgender Doppellösung:

   a) wässerige Azetonlösung (1 : 20) } zu gleichen Teilen.
   b) Nisslsche Methylenblaulösung }

   Man färbt so lange unter starkem Erwärmen, bis der Azetongeruch geschwunden ist.

4) Erkalten lassen; differenzieren in 0,1 prozentiger Alaunlösung, bis der Schnitt wieder rötlich wird (einige Sekunden—Minuten).

5) Abspülen, Alkoh. abs., Xylol, Benzinkolophonium (wie bei Nissl).

Die Nisslschen Körperchen erscheinen blau oder leicht violett, die Zwischensubstanz leuchtend rot gefärbt, rot auch die Kernmembran und Kernmasse, blau die Kernkörperchen, Nebennukleolen violett.

Zur Fixierung empfiehlt Held Pikrinschwefelsäure (24 Stunden), auswaschen in Aqua oder zunächst in 20 prozentigem Alkohol allmählich steigend (von 10 zu 10 %) bis zum absoluten Alkohol. Alkohol, Xylol (mehrmals), Paraffin.

Statt Alkohol sind auch Azetonlösungen zu verwenden (sowie Azetonxylol, erwärmtes Xylol, Xylolparaffin, Paraffin).

Die Methode von Cox zur Darstellung der fibrillären Gebilde in der zwischen Nissls Schollen gelegenen Substanz.

1) Fixieren (2—3 Tage) in:

	I oder	II
Sublimatlösung (gesättigt)	30,0	15,0
Platinchlorid (5 prozentig)		15,0
Osmiumsäure (1 prozentig)	10,0	10,0
Eisessig	5,0	5,0

2) Paraffineinbettung.

3) Die aufgeklebten Schnitte (5 μ) kommen 8 Stunden in 20—25 prozentige Tanninlösung.

4) Auswaschen, Färben mit Indoinblau oder Methylenblau.

   a) Indoinblaufärbung: 5—10 Minuten in 5 prozentiger Brechweinsteinlösung, auswaschen (10 Minuten), 12 bis 18 Stunden in folgender Mischung:

Alaunlösung (5 prozentig)	10,0
Indoinblau BB (Merk) (5 prozenttg)	20,0

b) Methylenblaufärbung: 5—10 Min. in 2,5 prozentiger Eisenoxydammoniumsulfatlösung, auswaschen (10 Minuten) 12—18 Stunden in folgender Mischung:

Phenollösung (2 prozentig)	15,0
Methylenblaulösung (alkalisch)	1—2,0.

Letztere setzt sich folgendermassen zusammen:

Methylenblau	1,0
Kaliumkarbonat	1,0
Aq. dest.	100; 5 Minuten zu kochen.

Die Mischungen der Farblösungen sind erst kurz vor dem Gebrauch herzustellen.

Nach dem Entfernen des überschüssigen Wassers mittels Filtrierpapier kommen die Objekte in Xylolalkohol (3 : 2), Xylol, Kanadabalsam. Etwa nötige Entfärbung geschieht mittels Unnas Alaun-Anilin.

Die Nervenzellenfärbung nach Roncoroni.

1) Härtung kleiner Stücke von $^1/_2$ cm Grösse in einer Mischung von Müllerscher Lösung und 0,8 prozentiger Platinchlorürlösung zu gleichen Teilen.
2) Wechseln der Flüssigkeit nach 5 Stunden, 1 Tag, 2 Tagen und 3 Tagen, wobei die Stücke noch 2 mal halbiert resp. gevierteilt werden.
3) Nach 5—6 Tagen in einfache 0,8 prozentige Platinchlorürlösung auf 1—2 Tage übertragen.
4) Abwaschen $^1/_2$ Stunde in Wasser; Alkohol, Zelloidineinbettung.
5) Färben in Alaunhaematoxylin 20—30 Stunden.
6) Auswaschen 24 Stunden und Differenzieren nach modifizierter Palscher Methode.
7) Auswaschen, Entwässern, Xylol, Kanadabalsam.

Die Schnitte dürfen nur 5—10 μ dick sein, damit wegen der Reichhaltigkeit der sämtlich gefärbten Nervenzellen ein klares Bild entsteht.

Herstellung der Haematoxylin-Alaunlösung: Zu 150 gr einer heissgesättigten und wieder erkalteten filtrierten Alaunlösung fügt man 5 Tropfen einer 1 prozentigen Lithion karbon.-Lösung zu, und 1 gr Haematoxylin, das in 10 gr Alkoh. absol. gelöst ist. Nach 20 Tagen ist die Lösung brauchbar.

Differenzierung in 0,1 prozentiger Kal. permangan.-Lösung (ca. 30°) danach Schnitte auf 2 Sekunden in eine Lösung von $\widehat{aa}$ 0,2 Acid. oxal. und Kal. sulfuros auf 100 Aqua, dann auf 10 Minuten bis 1 Stunde in 1 prozentige Lith. karbon.-Lösung.

Es färben sich die Protoplasmafortsätze der Purkinje Zellen kaffeebraun, die Purkinje Zellen selbst blau; die Kerne der Neuroglia und die Axenzylinder intensiv blau.

Um die Nervenzellen im Kontrast zur Neuroglia gefärbt darzustellen, möge man die Methode von Rehm versuchen, welche hier nach Goodall angeführt sei.

Die Methode nach Rehm.

1) Härten in 96 prozentigem Alkohol, danach in absolutem Alkohol.
2) Aufkleben auf Kork (mit oder ohne Zelloidin-Einbettung); Schneiden.
3) Färben in warmer 0,1 prozentiger Methylenblaulösung, höchstens $^1/_2$ Minute.
4) Differenzieren in 96 prozentigem Alkohol: die Nervenzellen treten scharf gefärbt hervor, wovon man sich bereits hier unter dem Mikroskope überzeugen möge.
5) Übertragen in eine Lösung von

   Fuchsin 0,1
   Alkohol (96 %) 100,0. $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde.

6) Auswaschen in Alkohol (ca. 1 Minute), bis keine roten Farbwolken mehr abgehen.
7) Nelkenöl; gründlich abtrocknen mit Fliesspapier, Einbetten.

In einem gut gelungenen Präparat erscheinen die Nervenzellen blau resp. blaurot gefärbt, die Glia tiefrot.

Die Kerne der Nervenzellen bleiben in normalen Fällen ungefärbt, das Kernkörperchen aber wird blaugefärbt. In pathologischen Fällen sieht man oft rote Körperchen in den Kernen der Nervenzellen.

Darauf hingewiesen sei, dass die Methylenblaufärbung im Vergleich zu der Fuchsinwirkung eine momentane ist. Auch sei noch folgendes bemerkt: Nelkenöl zieht Fuchsin aus, Origanumöl zieht Methylenblau aus; ist ein Schnitt daher zu blau, so wende man kurz Origanumöl an, ist ein Schnitt zu rot, so wende man kurz Nelkenöl an.

Die Methode nach Azoulay.

1. Härten in Müllerscher Flüssigkeit; einbetten, schneiden.
2. Auswaschen, färben auf dem Objektträger durch einige Tropfen einer $^1/_2$ prozentigen Ammoniumvanadlösung (2—3 Minuten).
3. Auswaschen mit einigen Tropfen Aq. dest.
4. Aufgiessen einiger Tropfen einer $2^1/_2$ prozentigen Tanninlösung (2—3 Minuten).
5. Auswaschen wie sub 3.

Die Prozeduren von 2—5 werden so lange wiederholt, bis die Nervenzellen und Axenzylinder grünschwarz erscheinen; dann erfolgt die Weiterbehandlung mit Alkohol und Einbettung wie üblich.

Von zwei Methoden nach Kronthal ergibt zunächst die ältere ohne Härtung gute Nervenzellbilder. Ein Stückchen grauer Substanz von der Hirnrinde oder Rückenmark wird auf einem Deckglas zerzupft und durch Auflegen eines zweiten Deckglases sanft zerdrückt; ganz wie bei Bakterienfärbungen werden alsdann beide Gläser von einander abgezogen, und die angetrocknete Substanz mit 1—3 Tropfen wässeriger 0,5prozentiger Methylenblaulösung gefärbt; letztere wird nach etwa einer Minute abgegossen, das Präparat dann, nachdem es trocken geworden, in Balsam eingebettet (auf dem Objektträger).

Ausser den Nervenzellen zeigen sich hier auch die Axenzylinder und Gliakerne gefärbt.

Kronthals neuere Färbung soll die Eigenschaften der Nisslschen und Marchischen Methode vereinen, resp. die Mängel der Golgi- und Ehrlichschen vermeiden, dass heisst, sie soll sämtliche Nervenzellen mit ihren Ausläufern in normalen und pathologischen Zuständen darstellen. Die Färbung besteht in der Bildung von Schwefelblei und beruht nach Kronthal in Gegensatz zu der Golgischen nicht auf einer Reaktion in Gewebslücken, sondern sie ist in den Gewebselementen zustande gekommen.

Die Technik der Färbung ist folgende:

1) Einlegen kleiner Stücke (bis 8 mm) in ein Gemisch von 10 prozentiger Formalinlösung und gesättigter wässeriger ameisensaurer Blei-Lösung $\overline{aa}$ (für 5 Tage).
2) Übertragen in 10 prozentige Formalinlösung und Schwefelwasserstoffwasser $\overline{aa}$ (5 Tage).
3) Alkohol steigender Konzentration, Zelloidineinbettung, Schneiden, Karbolxylol, Balsam.

Die Präparate scheinen sich gut zu halten, sowohl die Nervenzellen, wie die Nervenfasern sind dunkelgrau bis schwarz tingiert.

Corning modifizierte das Verfahren, indem er mit Formol (10 %) vorhärtete und das Mercksche Plumbum Formicium anwandte, statt es erst aus einer gesättigten Lösung von essigsaurem Blei durch Ameisensäure auszufällen. Zum Aufhellen empfahl er Nelkenöl, statt Zelloidineinbettung besser Schneiden zwischen Hollundermark nach Umgiessen mit dicker Zelloidinlösung. Paraffineinbettung zerstört das Resultat fast völlig.

Die Triacid-Färbung nach Rosin.

Je nachdem Alkohol- oder Zelloidinschnitte gefärbt werden sollen, werden verschiedene Mischungen verwendet. In jedem Falle freilich ist das Biondi-Ehrlichsche Dreifarbengemisch Säurefuchsin, Methylorange, Methylgrün das Agens, worin die ersten beiden Komponenten Säuren, die letzte eine Base ist; die Mischung selbst hat neutrale Reaktion. Die einzelnen Gewebselemente nun wählen sich je nachdem eine Säure oder die Base aus, dementsprechend nimmt Rosin acidophile, basophile oder auch sogar neutrophile Substanzen an. —

Für Schnitte ohne Zelloidin verwendet man Lösung A.:

Lösung A.	Dreifarbgemisch	0,4	5 Minuten färben.
	Dest. Wasser	100,0	
	0,5 prozentige Säurefuchsinlösung	7,0	

Für Zelloidinschnitte Lösung B.:

Lösung B.	Lösung A.	4,0	1 Minute färben.
	0,5 prozentige Säurefuchsinlösung	1,0	

Danach ist die Behandlung die gleiche:

2. Schnelles Abwaschen in Aq. dest., in 2 Schalen (1—2 Minuten).
3. Auswaschen in Essigsäurelösung (1 Tropfen Acid. acet. glac. auf 100,0 Aq. dest.) 10 Sekunden!

4. Nochmals Aq. dest., zum Entfernen der Essigsäure (1 Minute).
5. Übertragen in Alcoh. absol., so lange noch violette Farbe abgeht (2—3 Minuten).
6. Xylol, Balsam.

Eine gewisse Gefahr für das Gelingen guter Präparate liegt vielleicht in der Schnelligkeit der Prozedur Nr. 3, wenige Sekunden zu viel oder zu wenig können den Erfolg fraglich machen; doch scheint die Methode recht verwendbar, besonders für ein so kompliziertes Organ wie die Retina.

Die Präparate halten sich jahrelang gut; die Färbeflüssigkeit behält jedoch nicht über ein Vierteljahr ihre Kraft.

Die Zelloidinschnitte mögen aus dem Alkohol noch auf 1—2 Minuten in Wasser gebracht werden, bevor sie in die Farbe kommen.

Rosin gibt als Vorzüge seiner Färbung folgendes an:

1. Degenerationen treten deutlich hervor.
2. Blutextravasate werden gut dargestellt; neu gebildete Blutgefässe dokumentieren sich durch die Purpurfarbe der Gefässwand.
3. Kernzunahme wird deutlich gezeigt durch die blaugrüne Färbung der Kerne.
4. Die Struktur der Nervenzellen und des Kernes wird (in Alkohol-Präparaten) dargestellt.
5. Nervenzellen und Gliazellen sind deutlich von einander geschieden (die Fasern beider Zellen freilich nicht).
6. Exsudate (im Zentralkanal) dokumentieren sich durch rote Färbung von Albumen.

Die Methode nach Mosse

zur Darstellung von Einzelheiten der Nervenzellen.

1) Fixierung nach Carnoy-Gehuchten.
2) Paraffineinbettung.
3) Die aufgeklebten Schnitte kommen für ca. 2 Minuten in eine 1—2 prozentige Argentaminlösung.
4) Abspülen in destill. Wasser.
5) Überführen für kurze Zeit (ca. 1 Minute, bis die graue Substanz einen bräunlichen Farbenton annimmt), in eine 10'' Pyrogallollösung.
6) Wasser, Alkohol etc.

Hierbei erscheinen Grundsubstanz und Axenzylinder bräunlich, Nisslsche Körperchen, Zellkern und Kernkörperchen schwarz-violett. Andere Metallsalze (Gold-, Platin-, Palladium- und Platinsalzlösungen) ergaben nicht dies Ergebnis.

Darstellung des Pigmentes der Spinalganglienzellen nach von Lenhossék.[1])

1) Vorbereitung der Paraffinschnitte.
2) Verweilen der auf dem Objektträger aufgeklebten Schnitte über Nacht in konzentrierter alkoholischer Anilinblaulösung.
3) Auswaschen, differenzieren in Alk. absol. (hierbei hält nur das Pigment die dunkelblaue, fast schwarze Anilinblaufärbung fest).
4) Nachfärben mit Eosin oder Erythrosin (für die Darstellung der Zellgrenze).

Darstellung der Karyokinese im zentralen Nervensystem nach Weigert.

1) Härtung in Alkohol (96 %), wie bei Nissls Methode.
2) Möglichst feine Schnitte kommen in Tinctura ferri Rademacheri auf ½ Stunde.
3) Oberflächliches Abspülen in Wasser.
4) Färben in: Haematoxylin 1,0.
   Alkohol absol. 10,0,
   Aq. dest. 100,0. ½ Stunde.
5) Abspülen; kurze Differenzierung in salzsaurem Alkohol.
   Salzsäure . . . . 1,0.
   Alkohol (70%) . . . . 100,0.
6) 10 Minuten in Wasser; Alkohol, Öl, Balsam.

Darstellung der Mitosen im embryonalen Nervensystem.

a) Methode nach Merck.

1) Fixieren in 12 ccm	Chromsäurelösung (2 prozent.)	7.5.	+ Osmiumsäure (1%) 8,0.
	Eisessig	1,0.	
	Wasser	3,5.	

(1—2 Tage)

beide Flüssigkeiten werden erst kurz vor dem Gebrauch miteinander gemischt.

2) Färben in alkoholischer (33 prozentiger Safraninlösung) (12 bis 24 Stunden).
3) Entfärben in salzsaurem Alkohol.

---

[1]) Die Spinalganglienzellen des Menschen sind stark pigmentiert, mit zunehmendem Alter stärker.

b) Methode nach Altmann.

1) Fixieren in Salpetersäure (spez. Gew. = 1,02) (3—4 Stunden), danach beliebig lange Zeit in Alkohol.
2) Überfärben in Haematoxylin.
3) Entfärben in salzsaurem Alkohol.

Altmanns Methode ist übrigens auch dann verwendbar, wenn das Objekt (z. B. menschlicher Embryo) vorher nicht in Salpetersäure eingebracht war (Ziehen).

Rosin und Fengvessy, sowie Rothmann verwandten das Sudanrot (in alkoholischer Lösung) zur Darstellung einer fettartigen, zu den Lipochromen zu rechnenden Substanz; diese Substanz fand sich nur beim erwachsenen Menschen, nicht beim Neugeborenen. Rothmann wies sie auch im Lendenmark von mehr als 15 Jahre alten Pferden und einem alten Hunde in den Vorderhornganglienzellen nach.

Literatur.

Azoulay, Markscheiden- und Nervenzellenfärbung. Neurol. Zentralbl. 1895, Nr. 7.
Bielschowsky und Plien, Zur Technik der Nervenzellenfärbung. Neurol. Zentralbl. 1900, Nr. 24.
Corning, Über die Methode von P. Kronthal zur Färbung des Nervensystems. Anat.-Anz. Bd. 17.
Collier, A new Method of Staining Nerve Cells. Review of Neurol- und Psychiatry. Vol. I. Nov. p. 709.
Federici, Sul nuovo processo di Kronthal per la colorazione del sistema nervoso. Boll. r. Accad. med. Genova. Vol. 15, p. 29.
Flemming, Die Struktur der Spinalganglienzellen bei Säugetieren. Arch. für Psych. 1897, p. 969.
van Gehuchten, Modes de conservation du tissu nerveux et technique de la méthode de Nissl. Belgique médicale V. 22.
Goldscheider und Flatau, Normale und pathologische Anatomie der Nervenzellen. Berlin 1898.
Gothard, Quelques modifications au procédé de Nissl pour la coloration élective des cellules nerveuses. Compt. rend. des séances de la Soc. de Biol. 14. mai 1898.
Gudden, Anwendung elektiver Färbemethoden am in Formol gehärteten Zentralnervensystem. Neurol. Zentralbl. 1897, Nr. 1.
Held, Struktur der Nervenzellen. Arch. f. Anat. und Psych. 1897, III/IV.
Heidenhain, M., Artikel „Hämatoxylineisen“ in Encyklopädie der mikrosk. Technik. p. 517. 1903.
— Noch einmal über die Darstellung der Zentralkörper durch Eisenhämatoxylin etc. Zeitschr. f. wiss. Mikr. 1896, Bd. 13, p. 186 ff.
Holmgren, Weitere Mitteilungen über den Bau der Nervenzellen. Anat. Anz. XVI., p. 388 ff.

Hoyer, Bemerkungen zur mikroskopischen Untersuchung des Nervensystems. 1898. Gazeta lekarska Nr. 24 (Polnisch).

Hunter, Chromsilver-method for nerve-cells. Journ. of anat and phys. Okt. 1897.

Kantorowicz, Thioninfärbung. Zentralbl. f. allg. Path. 1894.

Kronthal, Eine neue Methode für das Nervensystem. Neurol. Zentralbl. Nr. 5, 1899.

v. Lenhossek, Bau der Spinalganglienzelle des Menschen. Arch. f. Psych. 1897, Bd. 29.

Lord, A new Nissl Methode. Journ. of Ment. Sc. Oct. 1898.

Luithlen und Sorgo, Zur Färbung der Ganglienzellen. Neurol. Zentralbl. Nr. 14. 1898.

Luzzato, Über die Ergebnisse der Nervenzellenfärbung in unfixiertem Zustande. Berl. klin. Wochenschr. Nr. 52, 1902.

Mann, G., Über die Behandlung der Nervenzellen für experimentell-histolog. Untersuchungen Zeitschr. f. wiss. Mikr. 1895, Bd. XI.

Marina, Fixationsmethode für Nissls und Weigerts Färbung. Neurol. Zentralbl. 1897, Nr. 4.

Merck, Darstellung der Mitosen im embryonalen Nervensystem. Denkschr. d. Akad. d. Wissensch. zu Wien, 1888.

Molbrecht, Modifikation der Pappenheimschen Färbung (Methylengrün. Pyronin) zur Darstellung des Tigroid der Ganglienzellen. Münch. med. Wochenschr. 1903, p. 40.

Mosse, Über Silberimprägnation der Nervenzellen und Markscheiden. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 23. 1900.

— Desgl. Arch. f. mikr. Anat., Bd. 59, p. 401.

Nissl, Die Neuronenlehre und ihre Anhänger. Jena, 1903.

— Artikel „Nervenzellen". Encyklop. der mikr. Technik, p. 488 ff. 1903.

— Veränderungen der Nervenzellen nach experimentell erzeugter Vergiftung. Neurol. Zentralbl. 1896.

— Nervenzellenanatomie. Neurol. Zentralbl. 1896.

Paton, Certain essential points in the technic of staining nerve-cells. Phil. med. Journ. Vol. 5, p. 123.

Pernitzky, Eine Variation der Nisslschen Ganglienzellenfärbung. Obosrenje Psichiatrii. 1903.

Polumordwinow, Über eine Modifikation der Nisslschen Methode. (Verein für Neuropathol. und Psychiatrie in Kasan, 14. Dez. 1897.)

— Zur Methodik der Färbung der Nisslschen Zellkörperchen. Nievrologitschesky Wiestnik., Bd. VII, H. 1 (russisch), 1899.

Rehm, Einige neue Färbungsmethoden zur Untersuchung des zentralen Nervensystems. Münch. med. Wochenschr. 1892.

Roncoroni, Colorazione del Prolungamenti protoplasmatici delle Cellule di Purkinje e dei cilindrassi prepio induramento dei pezzi in cloruro di platino e liquido del Müller. Arch. per le science medicale. Vol. XX. 1896, No. 9.

Rosin, Zur Färbung und Histologie der Nervenzellen. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 39, 1898.

Rosin und Fengvessy, Über das Lipochrom der Nervenzellen. Virch. Arch. CLXII. 1901.
Rothmann, Über das Lipochrom der Ganglienzellen. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 11, 1901.
Ruzicka, Ein Beitrag zur Untersuchungstechnik und zur Histologie der Nukleolen der zentralen Nervenzellen. Zeitschr. f. wissensch. Mikr. XIV. p. 452. 1898.
Sorgo, Demonstration von Präparaten von Ganglienzellen des Rückenmarks mit Färbung der Nisslschen Granulationen nach einem neuen Verfahren. Wien. klin. Wochenschr. XI. 19.
Steese, A Combination stain for ganglion-cells. Presbyt. Hosp. Rep. III, p. 345. 1898.
Turner, A method of examining fresh nerve-cells, with notes concerning their structure and the alterations caused in them by disease. Brain LXXX, p. 450 ff. 1898.
Zosin, Die Färbung des Nervensystems mit Magentarot. Neurol. Zentralbl. No. 5, 1902.

Die Golgische Methode (Chromsilbermethode 1873).[1]

Die ganz exzeptionelle Stellung, welche sich diese Methode errungen hat, bedingt auch eine gesonderte Besprechung, umsomehr, als die »Färbung«, sofern man von einer solchen überhaupt reden kann, die verschiedensten nervösen und nichtnervösen Bestandteile des Nervensystems darstellt, und man daher diese merkwürdige Methode — einerseits eine unelektive, andererseits wiederum regellos elektiv — nicht rubrifizieren kann.

Der technische Vorgang selbst ist zunächst folgender:[2]

Möglichst kleine Stücke (2—8 mm) vom frischen Zentralnervensystem werden direkt in folgende Lösung gebracht:

3 prozentige Kal. bichrom.-Lösung .	4 Teile,
1 prozentige Osmiumsäure-Lösung . .	1 Teil,

hier bleiben sie im Dunkeln 2—8 Tage, je nachdem man verschiedene Bestandteile darstellen will; nach v. Lenhossék sind erforderlich

2—3 Tage für die Neuroglia,
3—5 Tage für die Nervenzellen,
5—7 Tage für die Nervenfasern.

[1]) Vgl. C. Weigert: Merkel-Bonnet, Ergebnisse der Anatomie und Entwickelungsgeschichte 1896. Band V. Artikel Technik.

[2]) Metallnadeln sind durchwegs durch Glas- oder Hornstäbchen zu ersetzen.

Wenn nun auch die Lösung stets frisch und in grossen Quantitäten (10- bis 50faches Volumen) benutzt werden muss, so mag einmal gebrauchte doch dazu dienen, frische Stücke abzuspülen, oder auch, um die »doppelte Methode« durchzuführen.

Die Stückchen werden schnell in Wasser oder schon benutzter Silberlösung abgespült und nun in die 0,6 bis 1prozentige Argentum nitricum-Lösung übertragen (Zusatz von Essigsäure ist überflüssig); diese Höllensteinlösung darf einige Wochen alt sein, muss jedoch im Dunkeln gehalten werden; auch sie ist in grossen Quantitäten anzuwenden. Am besten hängt man die Stücke mit einem Faden an den Korken in der Flüssigkeit auf.

Nach 2—6 Tagen werden sie entweder direkt geschnitten oder erst noch in Alkohol (96 %) oder absoluten), der frei von Chloriden sei, 1/4—1/2 Stunde nachgehärtet. Durch Einschnitte überzeuge man sich, ob die Flüssigkeit genügende Reaktion auch im Innern verursacht, anderenfalls bringe man das Stück erst in die Chromosmiumlösung für 1—3 Tage, dann nochmals in die Argentum nitricum-Lösung.

Entweder schneidet man nun zwischen Klemmleber mit der freien Hand, oder man bettet in Zelloidin schnell während 5—30 Minuten ein. Nach kurzem Aufenthalt in Alkohol (80 %) schneide man; die Schnitte kommen einen Augenblick in absoluten Alkohol und dann in Bergamottöl, endlich werden sie auf dem Objektträger mit Fliesspapier getrocknet und in Xylol-Dammarharz eingebettet, indem man letzteren im Brutofen bei 40° trocknen lässt. Kein Deckglas. Sind die Stückchen auf dem Deckglas eingebettet, so befestige man dieses mit 2 Glasleisten auf dem Objektträger, doch muss zwischen letzterem und dem Harz resp. Präparat noch freie Luft bleiben.

Diese sogenannte »schnelle Golgische Methode« ist Ramón y Cajal zugeschrieben worden, sie findet sich aber bereits bei Golgi selbst in seiner Arbeit aus dem Jahre 1885: »Sulla fina anatomia degli organi del sistema nervoso centrale«.

Es ist diese jetzt allgemeine Methode die dritte von Golgi publizierte, und so finden wir das merkwürdige Ereignis, dass die Autoren der beiden vielleicht folgenschwersten Färbungsmethoden unserer gesamten Technik, Weigert und Golgi, erst mit ihren dritten Methoden der Markscheidenfärbung resp. der Nervenzellendarstellung ihr Ziel erreichten.

Die beiden ersten Methoden Golgis bieten in Kürze folgende Vorgänge:

1. Die »langsame« Methode (1873):

Kleine Stückchen wurden möglichst frisch in einer Lösung von

doppeltchromsaurem Kali gehärtet, anfangs in 2prozentiger Lösung, dann steigend bis zu 5prozentiger Lösung: je nach der Temperatur waren 15—45 Tage erforderlich, im Brutofen genügten (nach Weigerts Empfehlung) 8—10 Tage. Danach kamen die Stückchen in eine 0,75prozentige Argent. nitr.-Lösung auf einige Tage oder in eine 0,25–0,5prozentige Sublimatlösung auf 2—3 Wochen. Letztere musste täglich gewechselt werden und wirkte äusserlich entfärbend auf die anfangs braunroten Stücke.

2. Die »schnellere« Methode (1880) unterscheidet sich eigentlich nur dadurch von der jetzt gebräuchlichen, dass sie den Vorgang der Härtung mittels Chrom und Osmiumsäure in zwei Phasen vor sich gehen lässt; die Stückchen verweilen nämlich zuerst nur 4—5 Tage in 2prozentiger Kal. bichrom.-Lösung und werden nun in die Mischung von 2prozentiger Kal. bichrom.-Lösung (8 Teile) und 1prozentiger Osmiumsäurelösung auf 24—30 Stunden übertragen; danach folgt wie oben die Behandlung mit Argent. nitric.

Je nachdem man sich des Argentum nitricum oder des Hydrargyrum bichloratum bedient, hat man die Methoden als Silbermethode oder Sublimatmethode bezeichnet; der technische Vorgang ist aber bei beiden nach Vorstehendem fast gleich.

Endlich sei noch eine Modifikation von Golgi selbst erwähnt.

Die Modifikation der Golgischen Sublimatmethode von Golgi.

1) Härtung und Fixierung wie sonst (Müller, Sublimat).
2) Schneiden, auswaschen in Aq. dest.
3) 2 Minuten (oder länger) in ein Goldfixagebad, in welchem die Schnitte schwarz werden.
4) Sehr langes Auswaschen in Aq. dest., Alkohol, Nelkenöl, Balsam.

Das Goldfixagebad ist dasjenige, welches dem Photographen zur Fertigstellung der Aristopapierabdrücke dient.

Dass eine Methode, welche wie die Golgische bahnbrechend gewirkt hat und nach anfänglicher Unterschätzung in verhältnismässig wenigen Jahren die ungeheuersten Erfolge auf faseranatomischem Gebiete gezeitigt, sich eine fast schon unübersehbare Menge von Modifikationen hat gefallen lassen müssen, ist wohl verständlich, zumal wenn man bedenkt, dass, trotzdem hier die „Not zur Tugend“ wurde, eben doch eine grosse Reihe von Unzuträglichkeiten vorhanden sind, auf deren Eliminierung das Bestreben der Forscher gerichtet ist.

Aus der reichen Zahl von Modifikationen seien hier nur wenige angeführt.

Die Modifikation nach Obregia.

1) Vorbereitung wie bei Golgi (Silber- oder Sublimatpräparate).
2) Die Schnitte werden in absoluten Alkohol (resp. 96 prozentigen) und danach auf 1/2 Stunde in folgende frisch bereitete Lösung gebracht:

1 prozentige Goldchloridlösung	8—10 gtt.
Alkoh. absol.	10 ccm.

Die Lösung soll zuerst dem diffusen Licht ausgesetzt bleiben, mit den Schnitten jedoch im Dunkeln gehalten werden. (Es wird also das Silbersalz in ein Goldsalz verwandelt).
3) Schnelles Abspülen in 50 prozentigem Alkohol und in Wasser.
4) Übertragen in eine 10 prozentige Natriumsulfitlösung (5 bis 10 Minuten).
5) Gründliches Auswaschen in Wasser.
6) Eventuell kann jetzt noch eine Gegenfärbung mit Karmin-Hämatoxylin oder nach Weigert folgen.
7) Alkohol, Kreosot oder Xylol, Balsam; Deckglas.

Als Vorteil gilt hier, abgesehen von der ermöglichten Doppelfärbung die Benutzung des Deckglases.

Gudden empfiehlt für Golgis Methode an Stelle von Argentum nitricum organische Silberlösungen; er erzielte mit milchsaurem Silber (Aktol) brauchbare Bilder, es färbten sich mehr Zellen und Ausläufer als gewöhnlich. Diese organischen Ag.-Verbindungen dringen tiefer ein als Arg. nitr.; doch ergibt ein Teil derselben mit Chrom keinen Niederschlag, bei einem Teil zeigt sich die Chromsilberfällung nur bei neutraler Reaktion.

Die Modifikation nach Flechsig.

1) Härten in 2 prozentiger Kal. bichrom.-Lösung.
2) Imprägnierung mit Sublimat. [1])
3) Die Schnitte werden in 96 prozentigen Alkohol gebracht.
4) Färben der Schnitte während 3—8 Tage (bei 35° C.) in folgender Lösung:

Reiner Extrakt von japan. Rotholz .	1,0.
Alkoh. absol.	10,0.
Aq. dest.	100,0.
Gesättigte Lösung von Glaubersalz .	5,0.
Gesättigte Lösung von Acid. tartar. .	5,0.

[1]) Anmerkung: Das nach seiner Modifikation zuerst untersuchte Gehirn hatte Flechsig nach Härtung in Müllerscher Lösung ein Jahr lang in 1 proz. Sublimatlösung belassen (cf. Flatau S. 87).

5) Jeder einzelne Schnitt wird übertragen in 3 ccm einer 0,25 prozentigen Kal. permangan.-Lösung, bis dieselbe ihren blauen Farbenton verloren hat.

6) Entfärben in folgender Lösung:

Acid. oxal.	1,0.
Kal. sulfuros.	1,0.
Aq. dest.	200,0.

Wiederholung der beiden letzten Prozeduren, bis der Schnitt nicht mehr gelb ist.

7) Übertragen der Schnitte in folgende Mischung:

1 prozentige Goldchloridkaliumlösung	5 gtt.
Alkohol. absol..	20,0,

bis die Sublimatniederschläge, welche in auffallendem Licht weiss aussehen, tiefschwarz geworden sind und die rot gefärbten Nervenfaserbündel einen bläulichen Ton angenommen haben.

8) Schnelles Auswaschen in:

5 prozentige Zyankalilösung . . .	1 gtt.
Aq. dest.	20.0,

wobei der Schnitt auf der Oberfläche schwimmen muss.

9) Alkoh. absol., Lavendelöl, Balsam.

Alle Nervenfasern erscheinen karminrot, die Nervenzellen mit Fortsätzen tiefschwarz.

Die Methode nach Ziehen.

1) Härten der frischen Stückchen (ohne Chrombehandlung) in einer Lösung von

1 prozentiger Goldchloridlösung }
1 prozentiger Sublimatlösung } zu gleichen Teilen.

(3 Wochen bis 5 Monate). Die Lösung ist mehrfach zu wechseln; die Stücke werden in ihr rötlich-braun.

2) Aufkleben auf Kork (ohne Einbettung), schneiden unter Alkohol.

3) Übertragen in 4 fach verdünnte Lugolsche Lösung (oder in Tinct. jodi, welche mit Alkohol 4 fach verdünnt ist) je nach der Dicke des Schnittes verschieden lange Zeit; der Zellkörper soll durchscheinend und von blauschwarzer Färbung sein.

4) Alkoh. absol., Nelkenöl, Balsam.

Die Zellen, Fortsätze und Fasern erscheinen alle bläulich grau; sie sind zahlreicher als bei Golgis Methode gefärbt, vor welcher

Ziehen auch den Vorteil angibt, dass, abgesehen von der grösseren Haltbarkeit seiner Präparate, die Markfasern gefärbt werden.

Nach **Cox** kann man Härtung und **Sublimatfärbung** der Zellen verbinden, wenn man kleine Rindenstückchen 2—5 Monate je nach Jahreszeit und Grösse, in folgender Flüssigkeit lässt:

5 prozentige Kalium-bichromat-Lösung .	20,0
5 prozentige Sublimatlösung	20,0
5 prozentige Kalium-chromatlösung . .	16,0
Aq. dest.	40,0.

Die Kalium-bichromatlösung darf erst dann hinzugefügt werden, wenn die Flüssigkeit schon mit Aqua nach Vorschrift verdünnt ist. Nachbehandlung mit Ammoniak oder anderen Alkalien. — Die Imprägnation kommt nur zu Stande, wenn die Reaktion der härtenden Flüssigkeit möglichst wenig sauer ist; sie besteht aus einer Quecksilber-Oxydul-Verbindung, die mit Ammoniak in schwarzes Mercuroamid übergeht.

Geschnitten muss mit dem Gefriermikrotom werden, da Alkohol zu stark schädigen würde.

Die Schnitte kommen auf 1—2 Stunden in 5 prozentige Natrium-Karbonatlösung oder in Ammoniaklösung, werden ausgewaschen kurz entwässert, aufgehellt mit Öl (letzteres mit Filtrierpapier zu entfernen), und bedeckt mit dünner Schicht schnell trocknenden Harzes z. B.

Sandarak	75	Teile
Kampher	15	„
Terpentin	30	„
Lavendelöl	22,5	„
Absol. Alkoh.	75	„
Rizinusöl	5—10	gtt.

Diese Coxsche Methode ist von Robertson resp. Macdonald in folgender Weise modifiziert worden:

A) Robertsons Vorgang:

1) Schnitte in gesättigte Lithionkarbonatlösung gebracht. 15 Minuten.
2) Kurzes Auswaschen.
3) Im Dunkeln für 1—2 Tage in Mischung gleicher Teile von frischer Kaliumplatinchlorid- (1 %) und Zitronensäurelösung (10 %).
4) Auswaschen 1—2 Stunden.
5) Für 5 Minuten in gleiche Teile gesättigter Jodlösung in 1 prozentiger Jodkalilösung und Wasser.
6) Auswaschen.
7) Für 5 Minuten in eine Schüssel Wasser mit Zusatz von 2—3 Tropfen starker Ammoniaklösung.

8) Gut auswaschen.
9) Alkohol, Benzol, Benzolbalsam, dünnes Deckglas.

B) Macdonalds Methode ist ähnlich.

1) Cox' Imprägnation, Stück wird ausgewaschen über Nacht.
2) Alkohol, Schneiden, jeder Schnitt kommt in ein Uhrschälchen mit Alkohol.
3) Schnitte kommen in Aq. dest. für wenige Minuten.
4) 24 Stunden in { Lösung 1. 120 Teile. / „ 2. 30 „ }

Lösung 1: 1prozentige Kaliumplatinchloridlösung.

Lösung 2:	Natr. hyposulphit . .	1,5 Teile.
	Natr. sulfur.	0,75 „
	Natr. chlor.	0,25 „
	Aq. dest.	10,0 „

5) Schnitte 2 Minuten in dünner Salzsäure (1 : 80). (2—3mal!)
6) Nochmals in Lösung 2 für 10 Minuten.
7) Schnitte in Lösung von ca. 1% Jodspiritus und Aqua.
8) Nochmals in Lösung 2 für 10 Minuten.
9) Auswaschen 2 Stunden.
10) Alkohol, Benzol, Benzolbalsam, Deckglas.

Keine Metallinstrumente, stets Aqua dest. anwenden.

Bei beiden Methoden ist die Schwärzung stark und haltbar; die Präparate können unter Deckglas mit Ölimmersion und stärkster Vergrösserung betrachtet werden.

Aus der grossen Menge der Modifikationen, welche die Golgische Methode gezeitigt hat, kann man einerseits ihre grosse Bedeutung entnehmen, andererseits aber ergibt sich daraus auch klar, mit welchen Mängeln sie behaftet ist. Diese letzteren bestehen darin, dass ein Einblick in die feinere Textur der imprägnierten Elemente wegen der intensiven Schwarzfärbung der Zellen und Verästelungen unmöglich ist, sie bestehen ferner in der „Launenhaftigkeit", in den Niederschlägen, in der mangelnden Haltbarkeit und in der Schwierigkeit, Deckgläser bei der Montierung zu verwenden.

Was den ersten Punkt betrifft, so möge man ihn eliminieren durch die Anwendung der anderen Färbemethoden, die uns heute bereits so reichliche Einblicke in den feineren Bau der Elemente gewähren.

Die »Launenhaftigkeit« hat Ramón y Cajal bei der Imprägnierung von Gehirnen junger Tiere oder Embryonen als geringer erwiesen, die Färbung gelingt hier weit sicherer als bei Erwachsenen. Der Zusatz von Ameisensäure zu der Argentumlösung hat sich als überflüssig gezeigt, dagegen ergibt die Anwendung der »doppelten

Methode« (auch dreifachen Methode), die Cajal einführte, eine ungemeine Verbesserung der Resultate.

Ebensowenig wie die Niederschläge bisher mit genügendem Erfolg bekämpft worden sind, konnte die Haltbarkeit der oft leicht vergänglichen Präparate zu einer dauernden gemacht werden.

Tal verwandte Natriumsulfid; Greppin behandelte die Schnitte während 30—40 Sekunden mit 10prozentiger Hydrobromsäurelösung, bis sie weiss wurden, wusch sie dann aus und bettete sie ein; im Sonnenlichte wurden die Erfolge noch besser.

Greppin kombinierte auch die Markscheidenfärbung mit der Golgischen Methode, indem er die Schnitte (vor oder nach der Behandlung mit Hydrobromsäure) in $^1/_2$prozentige Chromsäurelösung auf 24 Stunden übertrug und dann wie üblich weiter behandelte.

Held wandte (wie später Obregia) nach dem Vorgang beim Photographieren eine Lösung von 1prozentiger Goldchloridkaliumlösung (5 Tropfen) in 20 gr absoluten Alkohols an.

Sehrwald schlug vor, ausser dem Alkohol auch das Xylol und den Kanadabalsam mit doppeltchromsaurem Silber zu sättigen, dann könne man die Schnitte mit Deckgläsern bedecken. Solche Präparate halten sich nun zwar etwas länger verderben, aber doch allmählich.

Was die Verwendung der teuren Osmiumsäure betrifft, so ist die Bedeutung derselben überschätzt worden, insofern, als Weigert bereits früher gefunden hat, dass sie zur Erzielung der Imprägnation absolut nicht erforderlich ist, und dass letztere auch nach einfacher Vorbehandlung mit Formol und Chromsalzen gut möglich ist; Held erzielte mittels letzterer allein (ohne Formol) gute Resultate. Die Güte der Färbung scheint eben auch hier besonders von der möglichsten Frische des verwendeten Materials abzuhängen, selbst wenn hier und dort (von Golgi noch nach 2 Tagen und besonders bei kaltem Wetter) über befriedigende Erfolge an nicht ganz frischem Material berichtet wird. —

Wie wenig wir jedoch noch imstande sind, das Geheimnis der Chromsilbermethode zu lösen, geht gerade aus den beiden Punkten hervor, dass auch ohne Osmiumsäure in vielen Fällen ganz vortreffliche Bilder erhalten wurden, und dass das Material unter Umständen wohl zu gebrauchen ist, auch wenn es nicht mehr frisch ist. Was den letzteren Punkt betrifft, so haben u. a. Experimente von Flatau, sowie von Kopsch den Beweis dafür geliefert. Kopsch verwandte für die „schnelle Imprägnation" das Formol am Material, welches bereits 24—48 Stunden alt war.

Folgendes ist der betreffende Vorgang:

1. Härten in Formol-Kal. bichrom. Lösung: (24 Stunden) (10,0 Formol + 40,0 Kal. bichrom. Lösung (3,5 %) kurz vor dem Gebrauch zu mischen.)
2. Übertragen in 3,5prozentiger Kal. bichrom. Lösung auf 3—6 Tage, danach in die Silberlösung.

Die Schnittkonsistenz ist eine sehr gute, die Niederschläge nicht sehr zahlreich.

Die Sublimat-Methode in der oben angeführten Modifikation von Cox, welche W. Krause besonders empfahl, wird neben der schnellen Golgi-(Golgi-Cajal)Methode heute am meisten verwendet, da bei ihr eine grössere Anzahl von Gewebselementen imprägniert wird und auch (nach Lenhossék) die Schnitte noch anders, z. B. mit Alauncarmin, nachzufärben sind.

Welches die Vorzüge dieser Golgischen Methode nun sind, ist bereits oben erwähnt worden; es bliebe nur zu wünschen, dass es gelänge, ohne Einbusse an diesen Vorzügen zu erleiden, die Methode auch so auszubilden, dass sie mit Erfolg für pathologische Zwecke in Betracht kommen kann; die diesbezüglichen Versuche Flataus, so schöne Präparate auch damit gewonnen wurden, werden wohl zunächst der langen Dauer wegen (1 Jahr) ohne das ersehnte Ergebnis bleiben.

Flatau härtete das Gehirn in toto 2—3 Monate in 3—4prozentiger Kal. bichrom. Lösung, entnahm dann kleinere Stücke den zu untersuchenden Stellen und legte sie in wässerige $HgCl_2$-Lösung von 1 : 1000, so dass auf jedes Stückchen mindestens 30 ccm Flüssigkeit kamen. In den ersten 2—3 Wochen wurde die Lösung jeden 2.—3. Tag gewechselt, bis keine gelbe Farbe mehr abging. Danach blieben die Stückchen noch ca. 9—12 Monate in der $HgCl_2$-Lösung, und zwar geschahen all diese Manipulationen im Dunkeln. Die Einbettung erfolgte in Zelloidin.

Um die nach ihm benannten netzförmigen Strukturen in den Nervenzellen zu färben, hat Golgi endlich noch folgende drei Prozeduren angegeben:

A) Die »schnelle« Methode mit der Modifikation, dass er 3proz. Kal. bichrom. 2 Teile + 1proz. Acid. osm.-Lösung 1 Teil benutzt.

Die netzförmigen Strukturen färben sich früher als die Nervenzellen, doch muss man die betreffende Zeit sorgfältig ausprobieren.

B) Härtung in obiger Lösung und Nachbehandlung in folgender Mischung: 3proz. Kal. bichrom. - Lösung und 4—5 proz. Cupr. sulf.-Lösung zu gleichen Teilen.

Dauer der Nachbehandlung (»Verjüngung«) je nach der Zeit der Härtung: 8 Stunden bis 10 Tagen. — Danach Übertragen in die Silberlösung.

C) Methode von Veratti. Die Stücke kommen in folgende Lösung:

5proz. Kal. bichr. . . .	30 T.
1 pro mille Platinchlorid .	30 T.
1proz. Acid. osmic. . .	15—30 T.

Weitere Behandlung wie bei Nr. A) und B).

Über den eigentlichen inneren Vorgang der Färbung: warum einerseits in so regelmässiger Weise, andererseits in so vollständiger Art die Elemente launenhaft sich imprägnieren, sind zwar eine grosse Anzahl von Theorien aufgestellt worden; nach Weigert muss man sich jedoch mit der Annahme begnügen, dass die grosse Unregelmässigkeit in der Imprägnation der Elemente des Zentralnervensystems in einer Unregelmässigkeit beim Eindringen der für die Imprägnation erforderlichen Flüssigkeiten zu suchen sei, und zwar müsse, da das doppeltchromsäure Kalium sehr regelmässig eindringe, das Silber resp. das Quecksilber dafür verantwortlich gemacht werden. Zum Verständnis der Methode aber können wir nach Weigert auch nur annehmen resp. konstatieren, »dass die für die Golgische Imprägnation geeigneten Elemente die Fähigkeit besitzen, einen sehr feinen eigenartigen Chromsilberniederschlag in sich entstehen zu lassen, wenn sie nach einer der von Golgi erfundenen Methoden behandelt werden«.

Literatur.

Bevan-Lewis, On a modified sublimate method for the delineation of nervous tissues. Edinb. med. journ. II. p. 136.

Cajal, Ramón y, Nuevas aplicaciones del método de coloración de Golgi. Barcelona 1889.

— Trabajos del Laboratorio histologico de la Facultad de Medicina de Barcelona 1891.

— Anat. Anz. Bd. IV 1889, Bd. V 1890.

— Die Retina der Wirbeltiere. Untersuchungen mit der Golgi-Cajalschen Chromsilbermethode und der Ehrlichschen Methylenblaufärbung. (Übersetzt von R. Greeff.) Wiesbaden 1894.

— Les nouvelles idées sur la structure du système nerveux chez l'homme et chez les vertébrés. Paris 1894.

Cox, Imprägnation des Zentral-Nervensystems mit Quecksilbersalzen. Arch. f. mikr. Anat. XXXVII 1891.

Dejérine, Anatomie des centres nerveux. T. I. Paris 1895.

Donaggio, A proposito di una modificazione del metodo sublimato per la colorazione dei centri nervosi. La Riforma Medica, Anno XIV. Febbraio.

Flatau, Modifikation der Golgischen Methode. Arch. f. mikr. Anat. Bd. XXXXV 1895.

Golgi, Untersuchungen über den feineren Bau des zentralen und peripherischen Nervensystems. (Übersetzt von R. Teuscher) Jena 1897. (Golgis gesammelte Abhandlungen über obiges Thema seit 1871!)

Greppin, Beitrag zur Kenntnis der Golgischen Untersuchungsmethoden. Arch. f. Anat. und Phys. 1889.

Gudden, Über eine neue Modifikation der Golgischen Silberimprägnations-Methode. Neurol. Zentralbl. XX. p. 151.
Hill, The chrome-silver method. A study of the conditions, under which the reaction occurs and a criticism of its results. London 1896.
Hunter, Chrome-silver method for nerve-cells. Journ. of anat. and phys. T. 32. Oct. 1897.
Kallius, Artikel „Golgische Methode“. Encyklopädie der mikr. Technik. p. 464 ff., 1903.
— Ein einfaches Verfahren, um Golgische Präparate für die Dauer zu fixieren. Anat. Hefte I, p. 271 ff. 1892.
Kopsch, Erfahrungen über die Verwendung des Formaldehyds bei der Chromsilber-Imprägnation. Anat. Anz. XI. Bd, p. 727 ff., 1896.
Landois, L., Zur Geschichte der Metallimprägnationen, insbesondere meines Anteils an der Erfindung der Behandlung der Gewebe mit chromsaurem Quecksilber. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 71, p. 123. 1902.
v. Lenhossék, Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuester Forschungen. Berlin 1895.
Nansen, Bergens Museums Aarsberetning, 1886.
v. Reusz, Die Verwendbarkeit der Golgischen Methode in der Physiologie und Pathologie der Nervenzelle. Magyar Orvosi Archivum. No. 3. 1902.
Robertson und Mc. Donald, Methode of rendering Golgi-sublimate preparations permanent by Platinum substitution. Journ. of Ment. Sc. Vol. 47 p. 1901.
Sala, Communicazione fatta all' Accad. d. Sc. Med. e Nat. di Ferrara. Juni 1897.
Sehrwald, Golgische Methode. Zeitschr. f. wiss. Mikr. VI, 1889.
Smidt, Zur Theorie der Golgi-Methode. Neurol. Zentralbl. Nr. 14, 1899.
Soukhanoff, Note sur l'imprégnation isolée des cellules névrologiques par la méthode de Golgi-Cajal. Journ. de neurol. 20. Mai 1900.
Weigert, Die Golgische Methode. Merkel-Bonnett, Ergebnisse der Anatomie und Entwiekelungsgeschichte (nebst Literaturangabe!) V. 1895.
Weil und Frank, On the evidence of the Golgi Methods for the theory of Neuron retraction. Arch. of Neurol. 1900, p. 265 und 292.
Ziehen, Eine neue Färbungs-Methode des Zentralnervensystems. Neurol. Zentralbl. 1891.

Die Ehrlichsche Methylenblau-Methode.

(Vitale Färbung.)

Einen bedeutenden Fortschritt, dessen Tragweite wir heute noch immer nicht ganz ermessen können, stellt die von Ehrlich im Jahre 1886 inaugurierte Methode dar, lebende Nervensubstanz mittelst subkutaner resp. intravenöser Injektion von Methylenblau zu tingieren.

Wie bei so vielen grossen Ideen konnte die Technik anfangs nur eine ganz ungenügende sein, und es vergingen sogar Jahre, ganz wie

bei der auf gleicher Höhe der Bedeutung stehenden Entdeckung von Golgi, ohne dass man auf diese Methode allgemein rekurriert hätte.

Immerhin war das Interesse dafür nie ganz geschwunden, und von den ersten Arbeiten (Aronson, Arnstein) über dieses Thema an ist bis auf den heutigen Tag in steigendem Masse die Erkenntnis aufgedämmert, dass wir es hier mit einer Entdeckung zu tun haben, deren Originalität ebenso gross ist, wie die bisher gezeitigten Ergebnisse es sind, welche eine glückliche Ergänzung zu den Golgischen Erfolgen bilden.

Eine Reihe von Namen knüpft sich nun an diese vitale Methode, und ein jeder Autor trug mehr oder minder dazu bei, gewisse Inkonvenienzen auszuschalten. Zwei Schwierigkeiten speziell boten sich dar, die anfangs unmöglich zu überwinden schienen: die Fixierung und die Herstellung von Schnitten. Beides ist jedoch jetzt relativ vervollkommnet dank der unablässigen Mühe von Forschern wie Apáthy, Bethe, Dogiel, S. Meyer, Smirnow u. a. Wenn nun auch sehr verschiedenartige Angaben und Modifikationen geschaffen worden sind, so erscheint es doch nicht vorteilhaft, ebenso wenig wie bei Golgis Methode, alle Variationen oder auch nur einen grösseren Teil anzugeben, da hiermit kaum ein klareres Bild geschaffen würde; daher sei es gestattet, eher ein »zu wenig« statt eines verwirrenden »zu viel« zu geben, und die Methode so zu schildern, wie sie sich nach den letzten Arbeiten von Bethe gestaltet. Gebührt diesem ja das Verdienst, entdeckt zu haben, dass das Methylenblau mit der Molybdänsäure eine in Alkohol unlösliche Verbindung eingeht, und somit das wichtige Postulat der Herstellung von Schnittpräparaten erfüllt zu haben, wenn wir auch andererseits die Fixierung mittels pikrinsauren Ammoniums Dogiel resp. Smirnow zu verdanken haben.

Die Technik der vitalen Methylenblaufärbung.

1. Subkutane resp. intravenöse Injektion (der betreffenden Organe) einer vorher filtrierten $^1/_4$—$^1/_6$ prozentigen Lösung von Methylenblau (rektifiziertes Methylenblau — Grübler) in physiologischer NaCl-Lösung.

Es lassen sich keine durchwegs giltigen Regeln dafür aufstellen, wann die subkutane, wann die intravenöse Injektion anzuwenden ist; im allgemeinen jedoch dürfte für das Zentralnervensystem der Säuger die subkutane Injektion, für das periphere Nervensystem der Säuger und das zentrale wie periphere der Wirbellosen die intravenöse Injektion vorzuziehen sein.

Membranöse Objekte, wie die Retina, kann man auch nach Aus-

breiten auf dem Objektträger und Auftropfen einer $^1/_{15}$—$^1/_{20}$prozentigen Methylenblaulösung färben, wobei man die Färbung nach ca. 20 Minuten unter dem Mikroskop beobachtet.

Das mit Methylenblau behandelte Objekt wird der Luft ausgesetzt.

2. Vorfixieren der möglichst kleinen Stücke in konzentrierter wässeriger Lösung von pikrinsaurem Ammonium bis zum Auftreten violetter Färbung (10—15 Min.).
3. Ohne Ausspülen Durchfixieren in einer der unten angegebenen Lösungen von Ammoniummolybdad oder phosphormolybdänsaurem Natrium (1—12 Stunden).
4. Auswaschen in Wasser, Entwässern in Alkohol, Xylol, Xylolbalsam oder Paraffineinbettung.
5. Event. Nachfärben mit Alaunkarmin, Alauncochenille oder neutralen Anilinfarben.

Dies in Umrissen der äussere Vorgang.

Zur Fixierung (3) empfiehlt Bethe eine der folgenden oder ähnlich variierten Lösungen:

I)	Ammoniummolybdad	1,0
	Aq. dest.	20,0
	Salzsäure (officin.)	1 gtt.
II)	Ammoniummolybdad	1,0
	Aq. dest.	10,0
	2 prozentige Chromsäurelösung .	10,0
	Salzsäure	1 gtt.
III)	Ammoniummolybdad	1,0
	Aq. dest.	10,0
	$^1/_2$prozentige Osmiumsäure . .	10,0
	Salzsäure	1 gtt.
IV)	Phosphormolybdänsaures Natron	1,0
	Aq. dest.	20,0
	Salzsäure	1 gtt.
V)	Phosphormolybdänsaures Natron	1,0
	Aq. dest.	10,0
	2 prozentige Chromsäure . . .	10,0
	Salzsäure	1 gtt.
VI)	Phosphormolybdänsaures Natron	1,0
	Aq. dest.	10,0
	$^1/_2$prozentige Osmiumsäure . .	10,0
	Salzsäure	1 gtt.

Zweck dieser Art der Fixierung war für Bethe der, erstens die früher erforderliche Eiskühlung fortfallen zu machen und zweitens auch bei schwer gelingenden Objekten sichere Resultate zu liefern.

Es ergab sich nun als empfehlenswert und naheliegend, »zunächst eine leichter lösliche Verbindung des Methylenblaus herzustellen, welche stets glatt ausfällt. und diese nachträglich in eine schwer lösliche Verbindung umzuwandeln«. Hierzu dient das Ammoniumpikrat, welches mit dem Methylenblau eine in Wasser fast unlösliche, in Alkohol leicht lösliche Verbindung eingeht, und diese letztere wird bei der Behandlung mit Ammoniummolybdat auch ohne Erwärmen in das molybdänsaure Salz umgewandelt (durch stark saure Ammoniummolybdatlösungen schneller). Das gleiche gilt von der Umwandlung des Methylenblaupikrats in das phosphormolybdänsaure Salz. —

Bethe zieht im allgemeinen die ersten drei Fixierungen vor, die letzten drei sind etwas weniger alkoholbeständig, — die Rezepte III und VI sind nur für Schnitte und dünne Totalpräparate geeignet und fixieren am besten. Die Dauer der Nachfixierung richtet sich nach der Grösse der Objekte: im allgemeinen genügen $^3/_4$—1 Stunde; bei Rezept III und VI ist es vorteilhaft, 4—12 Stunden zu fixieren, um gute Osmiumbräunung zu erhalten.

Ammoniummolybdad und phosphormolybdänsaures Natron werden unter Erhitzen in Wasser gelöst, bis keine Trübung mehr besteht; durch Zusatz von Salzsäure zu ersterer Lösung entstehen weisse Wolken von freier Molybdänsäure, die sich beim Schütteln zu sauren Salzen lösen. Durch Zusatz von Salzsäure zur Lösung von phosphormolybdänsaurem Natron entsteht eine gelbe Verfärbung durch Bildung freier Phosphormolybdänsäure, welche beim Schütteln unter Bildung saurer Salze wieder verschwindet.

Diese vitale Methode ergibt beim ausgewachsenen Tiere sehr schöne Bilder der nervösen Elemente; im Gegensatz zu Golgis Methode bleibt die Glia ungefärbt.

Um die Collateralen darzustellen, hat S. Ramón y Cajal die Ehrlich-Dogielsche Methylenblaufärbung etwas modifiziert, so dass es ihm gelang, seine mit Golgis Methode gemachten Beobachtungen zu bestätigen.

1) Dünne Stücke (frisches Kaninchengehirn) werden mit einer gesättigten Methylenblaulösung (Grübler) direkt mittels eines Pinsels bestrichen (oder mit Methylenblaupulver bestreut), nach $^3/_4$ Stunden schnell in schwacher Salzlösung abgewaschen.

2) Fixierung (2—3 Stunden) in:
Molybdänsaurem Ammoniak 10,0
Aq. dest. 100,0
Acid. hydrochlor gtt. X.

3) Entfernung des überschüssigen molybdäns. Ammoniaks in Wasser und härten (3—4 Stunden) in
Formol 40,0
Aq. dest. 60,0
1 prozentige Platinchlorürlösung . . . 5,0

4) Schnell abwaschen (Formolextraktion), einige Minuten in 1/3 proz. alkohol. Platinchlorürlösung, Paraffineinbettung.

5) Dicke Schnitte werden in Alkoh. absol. (mit Zusatz von 1/3 proz. Platinchlorür) entwässert; Xylol, Balsam.

Das Platinchlorür soll erstens fixieren, zweitens die Unlöslichkeit der Verbindung des molybdänsauren Ammoniaks mit dem Methylenblau erhöhen, so dass letzteres von Wasser, Formol, Alkohol etc. nicht angegriffen werden kann.

Die wichtige Frage, weshalb sich die Nerven im Methylenblau färben, hat Ehrlich selbst durch seine Experimente dahin beantwortet, dass die chemische Eigentümlichkeit dieses Stoffes, die in ihm enthaltene Schwefelgruppe, die Färbung der Nerven bedinge.

Wie bei der Golgischen Reaktion, so haben wir auch bei der Ehrlichschen das Ergebnis, dass selbst bei den bestgelungenen Präparaten nur ein Teil der Nervenfasern sich darstellt, und zwar scheinbar ganz wahllos gefärbt. Ehrlich hat sich bereits in seiner ersten Publikation bemüht, eine Erklärung hierfür zu finden, und er kam schliesslich zu der Ansicht, dass Sauerstoffsättigung und alkalische Reaktion die beiden Bedingungen seien, von denen die Methylenblaureaktion des Nervensystems abhängig wäre. Bemerkt sei hier noch, dass die Grosshirnrinde tatsächlich alkalisch reagierende Stoffe enthalten müsse, da Liebreich und Langgendorf Lakmus durch frische Rindenstücke gebläut fanden. Wenn nun Lieberkühn und Edinger mit Hülfe von Alizarininfusion nach Einführung einer violetten Natriumverbindung eine gelbe Färbung des Hirns auftreten sahen und dies auf eine saure Reaktion der Rinde bezogen, so muss man daraus die Existenz von sauer und alkalisch reagierendem Stoffe annehmen. Nimmt man nun ferner auch neutral reagierende Stoffe an, so gelangt man mit Ehrlich zu der Vorstellung, als ob im Nervensystem je nach dem Grade und der Funktion eine vieltönige Abstufung der Alkaleszensgrade stattfinde, die im Verein mit den Veränderungen der Sauerstoffsättigung darüber entscheidet, ob und welche Körper in bestimmten Territorien des Nervensystems aufgenommen werden können; fehlen diese Bedingungen in den betreffenden Nerven, so färben sich letztere nicht mit Methylenblau.

H. Aronson, Ehrlichs Schüler, wies darauf hin[1]), dass das Methylenblau durch verschiedene reduzierende Agentien unter Aufnahme zweier H.-Atome in Leukomethylenblau übergeführt wird, welches bei Luftzutritt von neuem in das blaue Oxydationsprodukt umgewandelt wird. Zu Lebzeiten sind die Nerven mit O so gesättigt, dass sie das aufgenommene Methylenblau nicht reduzieren; nach dem Tode des Tieres werden die Nerven farblos; sobald jedoch Luft, also auch O, freien Zutritt zu den Geweben erhält, wird das Leukomethylenblau von neuem oxydiert und in das blaue Oxydationsprodukt umgewandelt. Die Gewebe der höheren Wirbeltiere besitzen nach Aronson eine grössere Reduktionsfähigkeit als die der Kaltblüter. Arnstein und Smirnow stellten weitere Nachprüfungen, zunächst an Fröschen an, indem sie 1 ccm einer gesättigten Methylenblaulösung in die Vena cutanea magna einführten und nach 1—2 Stunden die verschiedenen Organe untersuchten, wobei sie die Endigungen der motorischen Nerven, die Spinalfasern und deren feinste Endausbreitungen auf der Oberfläche der sympathischen Zellen blaugefärbt erhielten. Dogiel und Arnstein injizierten alsdann die Farblösung unmittelbar in das Blut von Säugern und Vögeln, wobei jedoch die Kaninchen z. B. bereits nach 10 Minuten (4 Pravazsche Spritzen) zu Grunde gingen, und die Nerven sich dann unvollständig gefärbt zeigten. Daher wandte Dogiel nun die Injektion der Lösung in die Gefässe des frisch getöteten Tieres an, weiterhin suchte er die dem eben getöteten Tiere entnommenen Organe (und zwar zuerst Retina, Iris, Cornea) durch direktes Einwirken mit Farbstofflösungen verschiedener Konzentration zu färben, ein Modus, den dann auch Cajal benutzte.

Dogiel teilt nun die Färbungsverfahren in 4 Arten ein:

a) Injektion der Blutgefässe des Tieres mit einer $^1/_4$—$^1/_6$ prozentigen Methylenblaulösung.
b) Einführung einer $^1/_4$—$^1/_8$ prozentigen Methylenblaulösung in die Körperhöhlen, oder in die Hohlräume der betreffenden Organe.
c) Injektion einer $^1/_6$—$^1/_8$ prozentigen Lösung unter die Haut des Tieres oder in das, das zu untersuchende Organ umgebende Bindegewebe.
d) Unmittelbare Färbung des ausgeschnittenen Organs oder seiner Teile mit einer $^1/_4$—$^1/_8$ prozentigen Farblösung.

Stärkere Lösungen geben bei b, c und d schlechte Resultate.

Das Verfahren der Injektion der Blutgefässe (a) eignet sich gewöhnlich für die Untersuchung der Nerven in verschiedenen Organen und Geweben der Wirbeltiere, jedoch färben sich speziell die Elemente des Zentralnervensystems schlecht.

Verfahren b ist ausser bei Wirbeltieren auch bei Wirbellosen (von Retzius bei Crustaceen) angewendet worden.

Verfahren c (subkutane Injektion) eignet sich speziell für niedere Wirbeltiere (Reptilien, Amphibien). Semi Meyer wandte es auch zur Darstellung der Nervenelemente im Zentralnervensystem von Meerschweinchen, Katzen, Kaninchen an, und stellte, bei nachfolgender Fixation der frisch ausgeschnittenen Gehirnstücke nach Bethe, auf diese Weise die Purkinjezellen, Pyramidenzellen der Grosshirnrinde, Nervenzellen der Medulla oblongata etc. dar, Resultate, welche Dogiel und Cajal nur in schwachem Masse erhielten.

---

[1]) Vergl. Dogiel, Encyclopädie der mikrosk. Technik p. 809 ff.

Bei Verfahren d muss das betreffende Organ oder das kleine herausgeschnittene Stückchen möglichst blutleer sein, die Oberfläche wird mit geringer Menge Farblösung benetzt und von Zeit zu Zeit (im Thermostaten bei 37°) mit $^1/_{15}$ prozentiger Lösung angefeuchtet; nach 1—2$^1/_2$ Stunden wird fixiert. Arnold hat übrigens an der lebenden an einem Korkringe befestigten Froschzunge die feinsten Endausbreitungen durch Aufstauben von Methylenblau in Substanz gefärbt. Das von Cajal angewandte Vorgehen ist bereits oben erwähnt und es bleibt noch zu erwähnen, dass einzelne Forscher, wie Apáthy, die Nerven färben, indem sie die Präparate in Methylenblaulösungen verschiedener Konzentration eintauchen, ein Modus, den Apáthy besonders für Wirbellose verwandte. Bei höheren Wirbeltieren gibt dieser letzte Modus nach Dogiel schlechtere Resultate als die anderen Färbungen, wie denn überhaupt als bestes wohl das Verfahren b und d zu betrachten ist. Mit Recht freilich hebt Dogiel hervor, dass in jedem einzelnen Fall das betreffende Verfahren geändert werden muss, in bezug auf Stärke der Lösung, Dauer der Einwirkung etc., und dass alle derartigen Einzelheiten, von denen oft der Erfolg abhängt, sich nicht beschreiben lassen, sondern erst in längerer Praxis erkannt werden können.

Bei der sogenannten vitalen Färbungsmethode hat man also nach allem nicht zu vergessen, dass man darunter auch die Überlebend-Färbung der herausgeschnittenen Organe begreift; für welche Fälle diese oder die Injektion geeigneter ist, hängt auch von den chemischen Eigenschaften der Stoffe ab, welche L. Michaëlis in küpenbildende und nicht verküpende einteilt. Die Vorteile der vitalen Injektion kommen nach Michaëlis nur dann zur Geltung, wenn der Farbstoff leicht verküpt, d. h: dass die Leukokörper durch blosse Berührung mit der Luft wieder in die ursprünglichen Farbstoffe zurückverwandelt werden.

Ähnliche Eigenschaften wie das Methylenblau zeigen zwar auch Thionin und Toluidinblau, sie sind aber besonders wegen ihrer geringen Löslichkeit weniger zur vitalen Methode geeignet. Ausser den Thiazinen ist nach Michaëlis noch eine chemisch mit ihnen nicht verwandte Farbstoffgruppe befähigt, Nerven vital zu färben: Die Safraninazofarbstoffe und zwar das Diazingrün und Brillant-Diazinblau (Kalle), Farbstoffe, welche nicht verküpbar sind und sich daher hauptsächlich für die Überlebend-Färbung, weniger zur Injektion, eignen.

Nicht zu verwechseln mit der vitalen Färbung ist, wenn sie ihr auch nahe steht, die Färbung des frisch abgestorbenen Gewebes. Lässt man etwas stärkere Farblösungen einwirken oder dehnt man die Zeit der Beobachtung über den Tod der Zellen aus, so erhält man oft Färbungen, die sonst nicht zu erzielen sind; auf diese Weise erhielt schon Dogiel verschiedene Differenzierungen der Nervenzellen.

Literatur.

Apáthy, Behandlung des Nervensystems für histologische Zwecke. Zeitschr. f. wiss. Mikr. B. IX. 1892.

Arnold, Über Granula-Färbung lebender und überlebender Gewebe. Virch. Arch. B. 159. 1899.

— Weitere Beobachtungen über „vitale" Granulafärbung. Anat. Anz. XVI. Nr. 21—22. 1899.

— Über „vitale" Granulafärbung in den Knorpelzellen, Muskelfasern und Ganglienzellen. Arch. f. mikrosk. Anat. Bd. 55. p. 470 ff.

Arnstein, Die Methylenblaufärbung als histologische Methode. Anat. Anz. 1887. (I. u. II. Mitteilung).

Aronson, Methylenblaufärbung. In.-Diss. Berlin 1886.

Bethe, Studien über das Zentralnervensystem von Carcinus Maenas nebst Angaben über ein neues Verfahren der Methylenblaufixation. Arch. f. mikr. Anat. B 44. 1895.

— Eine neue Methode der Methylenblaufixation. Anat. Anz. 1896.

— Allgemeine Anatomie und Physiologie des Nervensystems. Leipzig. Thieme. 1903.

Cajal, Ramón y, Modifikation der Ehrlich-Dogielschen Methylenblaufärbung Rivista trimestr. mikroskop. Vol. I. Fasc. 2 y 3. (Neurol. Zentralbl. p. 1028. 1898).

— Die Retina der Wirbeltiere. Wiesbaden 1894.

Dogiel, Zur Frage über den Bau der Herbstschen Körperchen und die Methylenblaufärbung nach Bethe. Zeitschr. f. wiss. Zoologie v. Kölliker-Ehlers. Bd. 66. 1899.

— Artikel „Methylenblau zur Nervenfärbung". Encyclopädie der Mikr. Technik p. 809 ff. 1903.

Ehrlich, Über die Methylenblaureaktion der lebenden Nervensubstanz. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 4, 1886.

Hosch, Ehrlichs Methylenblaumethode und ihre Anwendung auf das Auge. Graefes Arch. Bd. 37, III. 1891.

Huber, The Methylenblue method for staining nerve tissues. Journ. appl. Univers., V, 1, 1898.

Hunter, The value of Methylenblue as an intra vitam stain in the tunicata. Journ. of appl. Microsc. Nr. 7, p. 1357, 1901.

Meyer S., Die subkutane Methylenblauinjektion, ein Mittel zur Darstellung der Elemente des Zentralnervensystems von Säugetieren. Arch. f. mikr. Anat. B. 46. 1895.

— Über eine Verbindungsweise der Neuronen. Nebst Mitteilungen über die Technik und die Erfolge der Methode der subkutanen Methylenblauinjektion. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 47. 1896.

— Über zentrale Neuritenendigungen. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 54, p. 296 ff., 1899.

Michaelis L., Die vitale Färbung, eine Darstellungsmethode der Zellgranula. Arch. f. mikr. Anat. Bd 55, p. 558, 1900.

— Einführung in die Farbstoffchemie. p. 93 ff. S. Karger 1902.

Retzius, Die Methylenblaufärbung bei den lebenden Amphioxen. Biol. Unters. N. F. VIII. 1898.

Turner, A note on the staining of brain in a mixture of methylenblue and peroxide of hydrogen; a vital reaktion in post-mortem tissue. Brain. London. Vol. 23, p. 524—529. 1900.

Wolff, Über die Ehrlichsche Methylenblaufärbung und über Lage und Bau einiger peripherer Nervenendigungen. Arch. f. Anat. u. Phys.-Anat. Abt. p. 155. 1902.

Zangger, Histologisch-farbetechnische Erfahrungen im allgemeinen und speziell über die Möglichkeit einer morphologischen Darstellung der Zell-Narkose. (Vitale Färbung.) Vierteljahrsschr. der Naturf.-Ges. in Zürich, p. 43, 1902.

B. Die Färbung der Markscheiden.

Unter all den Methoden der Markscheidendarstellung steht die geradezu klassisch gewordene Hämatoxylinfärbung nach **Carl Weigert** (1884) oben an.

Diese Methode, welche als Beweis ihrer epochalen Bedeutung, ebenso wie die Golgische sich eine Unzahl von Modifikationen hat gefallen lassen müssen, stellt sich zunächst folgendermassen dar:

1. Härten in Müllerscher, Erlitzkyscher oder reiner 5proz. Kal. bichr.-Lösung, im Brutofen bei 30°.
2. Direkte Übertragung der Stücke in Alkohol (am besten im Dunkeln und mehrfach wechseln); Einbetten in Zelloidin.
3. Kupferung der Stücke resp. der einzelnen Schnitte in einer halb mit Wasser verdünnten gesättigten Kupferazetatlösung. (24 Stunden im Thermostaten.)
4. Schneiden unter Alkohol, färben für 20 Minuten bis 24 Stunden in folgender Lösung:

Hämatoxylin . .	1,0
Alcoh. absol. . .	10,0
Lithion carbon .	1,0
Aq. dest. ad. . .	100,0.

5. Mehrfaches Abspülen in Wasser. Differenzieren in einer Lösung von

Borax	2,0
Ferridcyankalium	2,5
Aq. dest. . . .	100,0.

6. Gründliches Auswaschen. Alkohol 96 % (resp. absolut.), Xylol, Anilinxylol (2 : 1) (oder Origanumöl), Kanadabalsam.

Die markhaltigen Nervenfasern erscheinen blauschwarz auf braungelbem Untergrund.

Am besten hält man eine Stammfarblösung von Hämatoxylin und Alcohol absol. vorrätig, und tut erst zum Gebrauch Wasser, sowie

Lithion carbonicum (im Verhältnis von 1 : 100) hinzu; durch letzteres wird die vorher rötliche Farbe prachtvoll dunkelblau-violett. Die Differenzierung wird um so feiner und ist um so besser abzumessen, je mehr man die Differenzierungsflüssigkeit verdünnt; die graue Substanz wird hellbraun, die weisse dunkelviolett. Wenn dickere Schnitte sich schlecht differenzieren, so tut man sie nochmals in Alkohol auf 24 Stunden und dann nochmals in die Boraxferridcyanlösung. Doppelfärbung mit Alaunkarmin oder Pikro- oder Lithionkarmin ist möglich, um die Nervenzellen und -Kerne zu zeigen.

Ganz neuerdings empfahl Weigert am meisten zur Färbung der chromierten und gekupferten Schnitte einen fertigen Eisenlack:

1) 4 ccm des officin. Liq. ferri sesquichl. in 96 ccm Aqua,
2) 10 ccm der üblichen 10prozentigen alkoholischen Hämatoxylinlösung in 90 ccm 96prozentigen Alkohols —

zu gleichen Teilen direkt vor dem Gebrauch vermischt und umgeschüttelt. In dieser ganz schwarzen Farbe bleiben die Schnitte 12—24 Stunden, werden abgewaschen in Wasser und wie gewöhnlich differenziert. Hierbei färben sich nicht nur die feinsten Fasern, sondern der Untergrund erscheint auch ganz hell; ebenso werden die groben Markscheiden (z. B. der Nervenwurzeln) sehr gut gefärbt.

Will man die Schnitte auch nach anderen Methoden färben, so kann man die Kupferung statt an dem ganzen Stück auch nur an den für Hämatoxylinfärbung bestimmten Schnitten vornehmen.

Die einmal benutzte Hämatoxylinlösung ist nicht mehr zu verwenden; man giesse sie einfach weg.

Bereits zweimal vor Publizierung dieser Methode hatte Weigert versucht, eine Darstellung der Markscheiden zu geben, indem er das erste Mal (1882) Säurefuchsin (rosanilinsulfosaures Natrium) verwandte, mit Nachbehandlung von Kalialkohol, — nebenbei bemerkt: die erste Verwendung dieses Farbstoffes in der histologischen Technik, wie später Ströbe den Kalialkohol bei seiner Axenzylinderfärbung auch gebrauchte —; das zweite Mal wandte Weigert statt Säurefuchsin das gewöhnliche basische Fuchsin an mit nachfolgender HCl-Differenzierung. An dieser von seinem früh verstorbenen Schüler Lissauer zuerst im Druck publizierten Methode ist heute noch bemerkenswert, dass hier zum ersten Male ein basischer Anilinfarbstoff mit einer Beize verwendet wurde. Erst beim dritten Male benutzte Weigert die lackbildenden Farbstoffe, d. h. solche, welche mit Metallsalzen typische Verbindungen eingehen.

Eine nicht hoch genug zu schätzende Vervollkommnung, weil Beschleunigung des Prozesses, hat Weigert 1895 in seiner grossen Neuroglia-Arbeit angegeben; die Fixierung und Beizung ist danach bereits in 4—5 Tagen vollendet und zwar durch folgende Lösung:

5,0 Kalium (Natrium oder Ammonium) Bichromicum und 2,0 Chromalaun in 100,0 kochendem Wasser gelöst. hierzu setzt man noch 10 ccm Formollösung (10 %), oder aber man härtet vorher isoliert in dieser 10prozentigen Formollösung und beizt alsdann. Statt Chromalaun empfahl Weigert zuletzt Fluorchrom, welches leichter löslich ist und die Stücke nicht so brüchig werden lässt.

Auch die für die Neuroglia angegebene (v. i.) essigsaure Kupferoxyd-Chromalaunlösung resp. Fluorchromlösung ist für die Markscheiden-Färbung zu empfehlen, da sie an den chromierten Stücken keine Niederschläge macht und andererseits gegenüber der Seignettesalzlösung (v. i.) den Vorteil darbietet, dass eine weitere Kupferung mit einfach-wässeriger Lösung des Kupfersalzes überflüssig ist. (Weigert.)

Für diese Weigertsche Originalmethode wie für ihre Modifikationen gelten stets folgende wichtigen Punkte:

1) Die differenzierten Präparate sollen nicht gleich nach beendeter Differenzierung eingebettet werden, sondern 2—3 Tage in mehrfach zu wechselndem Wasser verweilen; denn erst durch diese Behandlung kann das Abblassen der Färbung verhütet werden. Aufenthalt in fliessendem Wasser ruft eine dunklere Tinktion der Präparate hervor.
2) Die Anwendung der doppelten resp. dreifachen Methode (welche überhaupt bei den meisten Färbungen sich empfiehlt) ist notwendig bei allen dickeren Schnitten.
3) Bei der Palschen Modifikation erfordert fast jeder einzelne Schnitt frische besondere Differenzierungsflüssigkeit.

Berkley gab an, dass sehr gute Färbungen erzielt wurden, wenn die Härtung in Flemmings Chromosmiumessigsäuregemisch vorgenommen wurde. Die Stückchen bleiben 30 Stunden in der Flüssigkeit (bei 25° C.), werden direkt in absoluten Alkohol auf 24 Stunden gebracht, welcher zweimal gewechselt wird. Nach Einbettung und Schneiden kommen die Schnitte in Wasser und in die Kupferazetatlösung über Nacht, werden schnell abgewaschen und gefärbt in einer abgekühlten, folgendermassen hergestellten Haematoxylinfärbung: 50 ccm Wasser werden kurz gekocht, mit 2 ccm gesättigter Lithion-karbonatlösung vermengt; dann fügt man 2 ccm der üblichen alkoholichen Haematoxylinlösung (1,0: 10,0) hinzu.

Die Schnitte verweilen in der Farbe 20 Minuten bei 40° C., werden ausgewaschen, differenziert und wie oben weiterbehandelt.

Um die Differenzierung zu ersparen, hat Weigert selbst eine Methode (1891) angegeben, deren elegante Bilder den Palschen nicht nachstehen, doch halten sich die hiermit erzielten Präparate nicht gut.

Weigerts Markscheidenfärbung ohne Differenzierung.

1) Härten in Kal. bichrom.-Lösung.
2) Zelloidineinbettung. Übertragen der Stücke:
3) 24 Stunden bei 35° in eine Flüssigkeit, die folgendermassen zusammen-

gesetzt ist: Kalt gesättigte und filtrierte Lösung von Cuprum aceticum neutrale, und 10prozentige Lösung von Seignettesalz in Wasser — zu gleichen Teilen (im Brutofen).

4) 24 Stunden in einfach wässeriger Lösung von neutralem Kupferazetat (im Brutofen).
5) Abspülen, $^1/_2$—1 Stunde in 80prozentigem Alkohol. Schneiden.
6) Färben in 9 Raumteilen der Lösung a und 1 Raumteil der Lösung b.:
Lösung a besteht aus 7 ccm gesättigter Lithion carbon.-Lösung und 93 ccm Aq. dest.
Lösung b besteht aus 1 gr Haematoxylin und 10 Alkoh. abs., beide Lösungen werden erst kurz vor dem Gebrauch vermischt.
7) Auswaschen, Alkohol 96prozentig, Anilinxylol (2 : 1), Xylol, Balsam.

Die feinsten markhaltigen Fasern sind nach 5—24 Stunden schwarz auf hellrotem Grunde gefärbt. — Zu dicke Schnitte kann man mit Boraxferridcyankalium differenzieren.

Von den zahlreichen Modifikationen sind am verbreitetsten die von Pal und Kulschitzky.

Die Palsche Modifikation der Weigertschen Färbung.

1. Härten in Müllerscher Flüssigkeit und weitere Behandlung wie bei Weigerts Methode, jedoch ohne Kupferung.
2. Schneiden; zeigen die Schnitte nicht die grünliche Färbung als Zeichen genügenden Chromgehaltes, so kommen sie noch einmal auf 24 Stunden in Kal. bichrom.-Lösung, oder in eine ganz dünne (0,3—0,5prozentige) Lösung von Acid. chrom. — Alkohol (70 %).
3. Färben in Weigerts Hämatoxylinlösung 24—48 Stunden (im Brutofen nur etwa 1 Stunde).
4. Auswaschen in Wasser, dem Lithionlösung etwa im Verhältnis von 4,0 : 100,0 zugesetzt ist.
5. Differenzieren in einer frisch bereiteten Kal. permanganicum-Lösung (etwa $^1/_3$ %) 20—30 Sekunden, die graue Substanz erscheint dann gelb.
6. Auswaschen. Weitere Differenzierung (nach Lustgarten) in:

Acid. oxalic.	1,0
Kal. sulfuros. (oder Natr. subsulfuros.)	1,0
Aq. dest.	200,0.

Nach wenigen Sekunden bereits ist die graue Substanz entfärbt, die weisse erscheint blauschwarz; andernfalls mögen die Schnitte nochmals in die Kalium permangan.-Lösung und Oxalsäureflüssigkeit gebracht werden.

7. Auswaschen; eventuell bringt man die Schnitte jetzt noch auf 5—30 Minuten in eine starke Lithionlösung, wodurch die Färbung intensiver wird; nochmaliges Auswaschen, Alkohol, Xylol, Balsam.

Die Markscheiden erscheinen schwarz oder blauschwarz, alle anderen nervösen Bestandteile sind entfärbt; deshalb sind Doppelfärbungen mit Alaun, Borax- oder Pikrokarmin mit grösserem Vorteil als bei der Originalmethode anwendbar.

Ist die Palsche Modifikation gut gelungen, so gibt sie sehr elegante Bilder; doch ist selbst bei grosser Sorgfalt hin und wieder eine zu starke Differenzierung mit Entfärbung der feinsten Fasern nicht ausgeschlossen; dagegen eignen sich besonders die dickeren Schnitte recht gut und die einzelnen Manipulationen gehen sehr schnell vor sich.

Um die Hämatoxylinlösung mehrfach verwenden zu können, ist empfohlen worden, die Schnitte isoliert erst in dem Hämatoxylin zu färben und danach in gesättigte Lithionkarbonatlösung zu bringen, bis sie genügend schwarz erscheinen.

Die Modifikation nach Kulschitzky.

1. Härten in Müllerscher Flüssigkeit (resp. Erlitzkyscher Flüssigkeit).
2. Einbetten, Schneiden.
3. Färben in einer Lösung von

   Hämatoxylin (in Alcoh. absol. gelöst) 1,0—2,0,
   2prozentige Essigsäure 100,0

   (1—24 Stunden).
4. Entfärben in einer Lösung von

   Lithion carbon. (gesätt. Lösung) . . 100,0,
   1proz. Lösung von rotem Blutlaugensalz 10,0.
5. Sorgfältiges Auswaschen, Alkohol, Öl, Balsam.

Die markhaltigen Nervenfasern erscheinen tiefblau resp. dunkelviolett, alles andere Gewebe ist farblos resp. schwach gelb.

Nach der ursprünglich angegebenen Färbung kommen die Schnitte in eine Lösung von

Hämatoxylin (in Alcoh. absol. gelöst) 1,0
Gesättigte Borsäurelösung 20,0
Aq. dest. 80,0;

diese Lösung muss direkt vor dem Gebrauch leicht mit Essigsäure angesäuert werden; sie ist anfangs gelb, nachdem sie rot geworden (nach ca. 3 Wochen) brauchbar.

Die Methode nach Wolters. (Kulschitzky-Wolters.)

1. Härten in Müllerscher Flüssigkeit, einbetten, schneiden.
2. Färben in Kulschitzkys Hämatoxylinlösung (24 Stunden im Brutofen).
3. Die Schnitte werden dann in Müllerscher Flüssigkeit getaucht und wie bei Pal differenziert.
4. Auswaschen, Alkohol, Xylol, Balsam.

Diese Kombination zweier Modifikationen ist sehr empfehlenswert wegen der schönen Bilder, die sie liefert; auch die feinsten Fasern erscheinen schön blauschwarz, die Nervenzellen gelbbräunlich.

Kaes hat für diese Modifikation Ersatz der Müllerschen Flüssigkeit durch Flemmings Gemisch empfohlen; die Tangentialfasern sollen hierdurch besonders gut erscheinen.

Die Modifikation der Weigertschen Markscheidenfärbung nach Vassale.

1. Härten etc. wie im Original.
2. Färben in einer 1prozentigen wässerigen Hämatoxylinlösung; 3—5 Minuten.
3. Abspülen, übertragen für 3—5 Minuten in eine gesättigte Lösung von neutralem essigsaurem Kupferoxyd.
4. Auswaschen, differenzieren in Weigerts Ferridcyankalilösung.
5. Auswaschen, Alkohol, Karbolxylol, Balsam.

Von Vorteil bei dieser Modifikation ist die grössere Einfachheit; auch fallen die eventuellen Hämatoxylin-Niederschläge fort und die Schnitte sind wegen des kürzeren Verweilens in der Farblösung weniger brüchig. Letztere möge stets möglichst frisch verwendet werden.

Die Modifikation nach Lissauer.

1. Vorbehandlung wie bei Weigerts Originalmethode.
2. Übertragen der Schnitte in 1prozentige Chromsäurelösung (erwärmen bis zum Auftreten von Blasen).
3. Auswaschen, färben in Weigerts Hämatoxylinlösung (ebenfalls erwärmen bis zur Blasenbildung).
4. Differenzierung nach Pal.

Wichtig ist diese »schnelle« Modifikation besonders dann für die Verarbeitung von Gehirnen, wenn letztere zu lange in Chromlösungen und Alkohol gelegen haben.

Empfehlenswert erscheint auch die **Modifikation nach Schaefer.**

1. Härten, einbetten, schneiden wie bei Weigert.
2. Die Schnitte kommen aus Wasser in Marchis Flüssigkeit für einige Stunden.

3. Auswaschen, färben in einer Lösung von 1 gr Hämatoxylin in etwas Alcoh. absol., wozu dann 100,0 einer 2prozentigen Essigsäurelösung gesetzt werden; die Schnitte bleiben in der Farblösung über Nacht.
4. Die schwarzen Schnitte werden ausgewaschen und nun wie bei Pal weiterbehandelt.

Die Kaisersche Modifikation der Markscheidenfärbung mittels Marchis Flüssigkeit.

1. Härten kleiner Stückchen in Müllerscher Flüssigkeit (3 Tage) die nochmals zerschnittenen kleinsten Stückchen kommen auf weitere 6 Tage wiederum in Müllersche Flüssigkeit.
2. Übertragen in Marchische Flüssigkeit (8 Tage).
3. Auswaschen, Alkohol, Zelloidin, Schneiden.
4. Die Schnitte kommen auf 5 Minuten in folgende Lösung:

Liq. Ferri sesquichlor..	10,0
Aq. dest.	10,0
Spirit. rectif.	30,0.

5. Übertragen in Weigerts Hämatoxylinlösung und Wärmen in einer erneuerten Farblösung während 5 Minuten.
6. Auswaschen, differenzieren wie bei Pals Modifikation.
7. Kurzes Übertragen in Wasser mit geringem Ammoniakzusatz.
8. Auswaschen, Alkohol, Xylol, Balsam.

Bei dieser Modifikation wird also das Kupferacetat durch eine Eisenchloridlösung als Beize ersetzt.

Die Markscheiden erscheinen schwarzbraun oder tiefschwarz.

Die Markscheidenfärbungen sind alle dem von Weigert eingeführten Prinzip der Hämatoxylinlackfärbung mit nachträglicher Differenzierung nachgebildet. Die Chromsäure (resp. das Salz derselben), mit welcher die Behandlung der Gewebe beginnt, spielt eine doppelte Rolle: sie fixiert die Substanz der Markscheiden, indem sie sie ihrer Löslichkeit in Alkohol beraubt, ferner beizt sie dieselbe für die nachfolgende Hämatoxylinfärbung. Dass die nachträgliche Beizung mit Kupfersalz nicht von unbedingt ausschlaggebender Bedeutung ist, beweist das Gelingen der Färbung auch ohne Beizung mit Kupferacetat und Kulschitzkys Modifikation. Die Kupferung ist nur eine nochmalige Beizung, so dass sich bei der nachfolgenden Behandlung mit Hämatoxylin jetzt nicht allein der Chromlack, sondern auch der Kupferlack bildet. Das Hämatoxylin wird nun von der in dem Gewebe haftenden Chromsäure zu Hämateïn oxydiert, die Chromsäure dabei zu basischem Chromsalz reduziert, und dieses resp. das gleichzeitig vorhandene Kupfer bildet mit dem Hämateïn den die Markscheiden färbenden Lack. Die Weigertsche Färbung ist regressiv, d. h. es wird zunächst alles überfärbt und danach teilweise entfärbt; dabei zeigt sich, dass der Farbstoff am längsten in den Markscheiden

haften bleibt, wohl weil er dort in grösster Menge aufgespeichert wird. Die Entfärbung beruht ausschliesslich auf einer Oxydation, diese geschieht original durch das mit Borax alkalisch gemachte Ferridcyankalium oder bei der Palschen Modifikation durch Permanganat.

Die Methode nach Adamkiewicz.

1) Härten in Müllerscher Flüssigkeit; einbetten, schneiden.
2) Übertragen der Schnitte in Wasser, das leicht durch HCl. angesäuert ist.
3) Färben in wässeriger dunkelroter Lösung von Safranin No. O.
4) Abwaschen in Alkohol, dann in absolutem Alkohol, der durch HNO_3 leicht angesäuert ist.
5) Nelkenöl, bis kein rötlicher Farbstoff mehr abgeht, Balsam.

Die normalen Markscheiden werden rot gefärbt, die pathologischen aber nicht mehr; Kerne der Nerven- und Gliazellen sowie der Gefässzellen erscheinen blauviolett.

Die Methode nach Exner.

1. Frische Stückchen kommen in das 10fache Volumen einer 1prozentigen Osmiumsäurelösung (im Dunkeln), die Lösung wird am 2. und 4. Tag erneuert.
2. Nach 6—10 Tagen auswaschen; die Stückchen werden auf Kork aufgeklebt und nachgehärtet in Alkohol. Schneiden.
3. Die Schnitte kommen in Glyzerin, welchem auf dem Objektträger 1 Tropfen Ammoniak (Liq. ammon. caust. 1,0 : Aquae 50,0) zugesetzt wird.
4. Die überschüssige Flüssigkeit wird mit Fliesspapier aufgesogen, nach vollendeter Aufhellung wird das Deckglas aufgelegt.

Die Fasern erscheinen grauschwarz. Da die Präparate nicht haltbar sind und das Ammoniak die Wirkung hat, dass der Durchmesser der Schnitte infolge Aufquellens zunimmt, so kommt diese unsichere und kostspielige Methode der Markscheidendarstellung wohl wenig in Betracht; sie besitzt hauptsächlich nur mehr historisches Interesse als erster Versuch einer Markscheidendarstellung.

Haltbarere Präparate erzielt man mit der

Palschen Modifikation der Exnerschen Methode.

1. Härten wie bei Exner.
2. Auswaschen auf 2 Minuten in Alcoh. absol. Einbetten.
3. Die Schnitte kommen in eine Mischung von Glyzerin und Wasser (3 : 1); das Glyzerin wird durch Wasser weggewaschen.
4. Differenzierung wie bei Pal; auswaschen.
5. Nachfärben mit Pikrokarmin, Alkohol, Xylol, Balsam.

Zu erwähnen wäre hier noch

die Osmierung der Markscheiden nach Heller,

deren technischer Vorgang weiter unten beschrieben ist. Heller weist darauf hin, dass, abgesehen davon, dass hier leicht eine Kombination mit Kernfärbungen vorgenommen werden kann, es von Vorteil sein dürfte, an aufeinanderfolgenden Serienschnitten die Veränderungen an der Markscheide mit Osmium und mit Weigerts Hämatoxylin vergleichend und kontrollierend zu untersuchen.

Hellers Methode ist übrigens folgendermassen durch Robertson modifiziert und in ihrer Dauer abgekürzt worden.

1. Härten in einer modifizierten Weigertschen Chromalaun-Kupferlösung.

Chromalaun	2,5.
Kupferazetat	5,0.
Essigsäure	5,0.
Formol	2—10,0.
Aq. dest.	100,0.

2. Auswaschen in Wasser. Zelloidineinbettung.
3. Die Schnitte kommen in 1 prozentige Osmiumsäurelösung und in 5 prozentige Pyrogallussäure (je $^1/_2$ Stunde).
4. Übertragen in 0,25 prozentige Kal. permang. Lösung (1—4 Minuten), dann in 1 prozentige Oxalsäure (5 Minuten). Jedesmal auswaschen!
5. Alkohol, Einbetten.

Besonders rühmt Robertson diese Färbung für die feinen markhaltigen Fasern des Gehirns; eine Kontrastfärbung mit Haematoxylin stellt die Nervenzellen gut dar.

Während nun das Prinzip der Weigertschen Methode (und ihrer Nachbildungen) darauf ausgeht, die normalen Markscheiden positiv darzustellen, so dass degenerierte Partien sich von dem gelblich-braunen Untergrund nicht mehr abheben, besitzen wir in einer anderen wichtigen Methode, und zwar der von Marchi-Algeri, ein Gegenstück zu Weigerts Vorgang, derart, dass gerade die im Zustande der Degeneration befindlichen Markscheiden positiv auf das Färbemittel, nämlich die Überosmiumsäure, in Gestalt von kettenartig angeordneten schwarzen Schollen reagieren.

Die Marchische Methode. (Marchi-Algeri.)

1. Fixierung kleiner Stücke für mindestens 8 Tage in Müllerscher Flüssigkeit (event. nach vorheriger Formolfixation).
2. Übertragen in eine frisch bereitete Mischung von Müllerscher Flüssigkeit und 1 prozentiger Osmiumsäurelösung im Verhältnis von 3 : 1, 2 : 1, zuletzt zu gleichen Teilen (6—50 Tage im Brutofen).
3. Auswaschen in weichem, fliessendem Wasser (24 Stunden).
4. Härten in Alkohol; Zelloidin; Schneiden; Einbetten.

Die im Zustand der Degeneration befindlichen Markscheiden

erscheinen schwarz, alles andere hellgelb, manchmal mit grünlichem Schimmer.

Diese hochwichtige Methode beruht auf folgenden Tatsachen: Wird eine markhaltige Nervenfaser experimentell oder durch einen pathologischen Prozess von ihrer Ursprungszelle abgetrennt, so beginnt nach dem Wallerschen Gesetze der periphere Abschnitt zu zerfallen; hierbei löst sich die vorher intakte Markscheide in kleinere und grössere Kügelchen auf und es bilden sich an Stelle der kontinuierlichen Markscheide eine Reihe lose aneinander liegender Myelinkugeln. Während sich nun das Myelin des intakten Nerven in der Chromosmiumlösung nur schwach gelblich färbt, färben sich die Myelinkügelchen nach Durchtrennung des Nerven schwarz. Nach Redlichs Ansicht geht normales Nervenmark mit dem chromsauren Kali eine Verbindung ein und verliert so die Fähigkeit, sich mit Osmium zu färben; diese Verbindung aber gehen Fett und Zerfallsprodukte des Marks nicht ein. Mott meint, dass die phosphorhaltigen Fettsubstanzen sich bei der Degeneration der Nervenfasern spalten, wobei es neben Glyzerinphosphorsäure auch zur Bildung von phosphorfreiem Fett kommt, das sich durch Osmium schwärzt.

Diese ungemein wertvolle und wichtige Methode, eine Kombination von Härten und Färben, erfordert mehrere besondere Massregeln. In erster Linie muss die Herausnahme von Gehirn und Mark mit grösster Vorsicht vorgenommen werden, damit alle Zerrungen vermieden werden; denn diese können nur zu leicht falsche Resultate bei der Färbung provozieren.

Die Flüssigkeit mit den Stückchen, welche äusserst dünn sein sollen (2—3 mm), bringt man in den Brutofen bei 25—30°; es ist sorgfältig auf Erneuerung der Flüssigkeit zu achten, sobald der Osmiumsäuregeruch verschwindet; die Stückchen sollen auf Glaswolle möglichst auf der Kante, nicht auf der Fläche liegen, resp. ist durch oftmaliges Umschütteln für ein gleichmässiges Eindringen zu sorgen. Bei Zimmertemperatur erfolgt letzteres langsamer.

Da der Alkohol gechromte wie osmierte Markscheiden und ihre Produkte verändert, so empfiehlt Nissl („Nervensystem“ in Encyclopädie der mikr. Techn. S. 962) möglichst Vermeidung der Zelloidineinbettung, was um so eher angängig ist, als nach sorgfältiger Behandlung nach Marchi die Konsistenz der Gewebsstücke ganz ausgezeichnet ist. Besonders beim Nachweis sehr kleiner Faserbündelchen soll man bestrebt sein, die dicken Schnitte aus uneingebettetem Material herzustellen. Ist aber die Zelloidineinbettung notwendig, so lasse man die dünnen Gewebs-

scheiben möglichst kurze Zeit direkt nach der Entwässerung in 96 % resp. absolutem Alkohol (bis je 24 Stunden), ebenso in dünnem und dicken Zelloidin. Auch die Nachhärtung in 80 % Alkohol soll nicht über 24 Stunden währen, bis die Schnitte angefertigt werden.

Die Schnitte selbst dürfen dick sein (50 bis 80 μ). Degenerationen geben sich — sofern sie nicht älter als mehrere Monate sind — in kettenartiger Anordnung durch schwarze Myelinklumpen und Detritus kund. Auch fettige Degenerationen an Nervenzellen und Blutgefässen treten deutlich hervor. Für experimentelle Untersuchungen sollen die Tiere am besten nur 2—4 Wochen am Leben bleiben. Bei der menschlichen Pathologie darf man auf Resultate auch nach mehrmonatlicher Dauer des Prozesses rechnen.

Eine Nachfärbung mit anderen Methoden (Weigert-Pal, Carmin, van Gieson, Azoulay) ist möglich.

Für die Untersuchung des Gehirns resp. Hirnstamms ist ein Aufenthalt der nicht über 2 mm dicken Stückchen in der Marchischen Flüssigkeit für 4—6 Wochen erforderlich, während für das Rückenmark und peripherische Nerven 8—12 Tage genügen; die Flüssigkeit ist im ersteren Fall schwach konzentriert (1 : 3) und unter allmählicher Steigerung bis zum Verhältnis von 1 : 2 resp. 1 : 1 zu verwenden und oft zu wechseln. Durch Einschnitte in die Hirnsubstanz überzeuge man sich nach etwa 4 Wochen, ob die Flüssigkeit auch in die zentraleren Partien genügend eingedrungen ist.

Eine andere Methode, das Fett frisch zerfallener Markscheiden zu färben, ist von Benda mit dem von L. Michaëlis als spezifisches Fettfärbemittel publizierten Scharlachrot angegeben worden. Gefrierschnitte (Formolmaterial) werden nach Weigert gefärbt, dann in gesättigter alkoholischer (70 %) Lösung von Scharlachrot nachgefärbt. Die Präparate können in Gummiglyzerin oder Kali aceticum aufbewahrt werden.

Azoulay hat die Eigenschaft der Osmiumsäure, sich mit Tannin schwarz zu färben, benutzt, um die Schwärzung der Rückenmarkstückchen noch zu verstärken. Nach voraufgegangener Behandlung mit Müllerscher Flüssigkeit und Alkohol werden sehr feine Schnitte mit Osmiumsäurelösung (1,0 : 500,0) kurz geschwärzt und dann mit 5prozentiger Tanninlösung ca. 5 Minuten erwärmt; auswaschen (event. Nachfärben mit Karmin) und einbetten wie üblich. Nur das Myelin färbt sich hierbei schwarz.

Nach Edinger leistet die Methode Gutes für die mittleren und gröberen Fasern, aber nicht für die feineren Fasern so Gutes wie die Haematoxylinfärbung. Die Methode ist vortrefflich z. B. bei Marchi-Präparaten, da man hierbei den Ausfall leicht dort erkennt, wo die Zerfallsprodukte etwa schon resorbiert sind; sie ist aber auch bei Golgischen Präparaten anwendbar. Obersteiner empfiehlt das Verfahren besonders für die Untersuchung von Nervenwurzeln und peripheren Nerven.

Mit Anwendung der Osmiumsäure hat auch M. Borchert und zwar am Zentralnervensystem niederer Wirbeltiere gute Erfolge erzielt:

1. Fixaktion des Gehirns in Formol (10%).
2. 3 mm dicke Gehirnscheiben bleiben 24 Stunden in 1 prozentiger Osmiumsäure.
3. Auswaschen in Aq. dest. (mehrere Stunden), Alkohol, Paraffineinbettung.
4. Differenzierung der Schnitte nach Lustgarten-Pal.
5. Gründliches Auswaschen in fliessendem Wasser, Alkohol, Karbolxylol, Kanadabalsam.

Diese Methode eignet sich nicht für grosse Gehirne, sondern nur zur systematischen faseranatomischen Untersuchung des erwachsenen und foetalen Selachiergehirns. Die Präparate sind wie alle Osmiumpräparate recht haltbar.

Bemerkenswert erscheint noch ein Vorgang, den Allerhand angegeben hat:

Methode nach Allerhand.

1. Härten in Müllerscher Flüssigkeit oder Alkohol, einbetten schneiden.
2. Die Schnitte kommen in Eisenchloridlösung und zwar in die 50prozentige Lösung des offizinellen Liquor ferri sesquichlorati (15—20 Minuten, bei schwachem Erwärmen erfolgt die Reduktion des Metallsalzes leichter).
3. Kurzes Abspülen, übertragen in eine 20prozentige Tanninlösung (1—2 Stunden im Brutofen); dieselbe muss durch ca. 3 Wochen erst im Licht unter Schimmelbildung sich zersetzt haben und danach filtriert worden sein.

   Die Differenzierung beginnt fast sofort, wobei das Eisensalz durch die Gerbsäure reduziert wird; die Schnitte werden dunkelschwarz-blau. (Eventuell doppelte Methode mit Zurückbringen in die Eisenlösung.)
4. Differenzierung nach Palschem Verfahren, jedoch mit doppelt so starken Lösungen (zur Zeitersparnis).
5. Auswaschen, übertragen in 0,5prozentige Essigsäurelösung (einige Minuten), Alkohol, Xylol, Balsam.

Die Methode beruht also wesentlich auf einer Doppelfärbung mit Eisenchlorid-Tannin und einer Differenzierung nach Pal. Die markhaltigen Fasern, auch die Tangentialfasern, erscheinen intensiv blau-schwarz, auf farblosem Untergrunde. — Ebenso sind die Nervenzellen mit Ausläufern deutlich sichtbar mit schwarzen Kernkörperchen, und zwar bei Alkoholpräparaten noch mehr, während bei Chrompräparaten die Fasern mehr hervortreten. —

Im Falle der Alkoholhärtung sind die gleichen Stücke sowohl für Nervenfaserfärbung wie für Nissls Methode zu verwenden. Was in diesem Falle von

den Nervenfasern gefärbt wird, kann zweifelhaft sein, da ja die Markscheide wegen Extraktion des fetthaltigen Myelins zum grossen Teil zerstört ist, also auch nicht in toto blau gefärbt sich darstellen kann. Diese Reste der Markscheide bringt Allerhand mit dem Kühne-Ewaldschen Neurokeratingerüst in Beziehung und er hält die zwei an Alkoholpräparaten sich darstellenden konzentrischen Ringe für die Querschnitte der äusseren und inneren Hornscheide der Markfaser. Aber auch der Axenzylinder tritt an Alkoholpräparaten (wenn auch nicht durchwegs) als intensiv blau gefärbtes, geschrumpftes, zackiges Gebilde hervor.

Bei diesem „Imprägnierungsverfahren" dürfen die einmal gebrauchten Lösungen mehrfach verwendet werden, speziell das Tannin scheint bei mehrfacher Anwendung an Färbungskraft, d. h. Reduktionskraft zu gewinnen.

Hans Aronson hat das Galleïn für die markhaltigen Fasern in folgender Art angewendet:

Galleïn Paste	3—4 ccm.
Alcoh. absol.	20,0
Aq. dest.	100,0
Sol. natr. carbon. (konzentr.) .	III gtt.

Vorbereitung und Differenzierung wie bei Weigert-Pal; nach der letzteren kommen die Schnitte in Soda, bis sie rot werden. —

Auf den mit Galleïn rot gefärbten Fasern haften basische Farbstoffe, denen das saure Galleïn als Beize dient, sehr fest, so dass man das Rotbild z. B. in Blau überführen kann. Man kann also die in Kal. permangan.-Lösung entfärbten Schnitte 12—24 Stunden in eine alkoholische Methylenblaulösung bringen und sie maximal (in H_2O, Alkohol und Origanumöl) entfärben, solange noch Farbstoff abgegeben wird. Die Nervenfasern sind dann dunkelblau, Ganglienzellen, Substantia gelatinosa und Neuroglia blassgrünlich.

Eine von Fränkel empfohlene Markscheidenfärbung soll nicht nur die Tangentialfasern, sondern auch die Fasern der supraradiären Schicht deutlich darstellen.

1. Fixieren in Weigerts Kalibichromicum-Chromalaun-Lösung.
2. Alkohol. Zelloidineinbettung.
3. Färben (4—24 Stunden) in polychromem Methylenblau. (Flüssigkeit kann abgegossen und wieder benutzt werden.)
4. Abspülen in Aq. dest. (kein Leitungswasser).
5. Differenzieren in möglichst alter gesättigter wässriger Gerbsäurelösung (bis graue und weisse Substanz deutlich zu unterscheiden sind).
6. Wiederabspülen in Aq. dest.
7. Wiederholung von Färben und Entfärben.
8. Alkohol (96 %), Öl, Xylol, Kanadabalsam.

Um die Markscheiden darzustellen, verfährt ferner Mosse folgendermassen:

1. Härtung in Müllerscher Flüssigkeit.
2. Nachhärtung in Alkohol (ohne Wasser!).
3. Zelloidineinbettung.
4. Einlegen der Schnitte in Müllersche Flüssigkeit (24 Stunden).

5. Übertragen der Schnitte auf 10 Minuten in eine 1—2prozentige Lösung der Argentaminflüssigkeit.
6. Abspülen in Wasser.
7. Reduktion in 10prozentiger Pyrogallollösung (1—2 Minuten).
8. Abspülen und Differenzieren nach Pal etc.

Markscheiden erscheinen braunschwarz, Nervenzellen zitronengelb.

Zum Zwecke einer elektiven Markscheidenfärbung versetzt endlich Schrötter eine 5prozentige Lösung von Alizarin mit einigen Tropfen einer 5prozentigen Oxalsäurelösung, bis der Farbstoff orangegelb ist.

Die Schnitte bleiben 2—3 Stunden darin, werden abgespült und kommen in eine 3prozentige Sodalösung, wo sie rotviolett werden, bis sie keinen Farbstoff mehr abgeben. Alcoh. absol., Balsam.

Die Markscheiden sind dann leuchtend rot, das übrige Gewebe farblos.

Für die Untersuchung der Markscheiden ist auch das Polarisationsmikroskop verwendet worden; der erste war wohl in dieser Hinsicht Schiff, ihm folgten Ambron und Held, Brodmann u. A. Obwohl die positiven Ergebnisse dieser Untersuchungsmethode bisher geringfügige waren, dürfte es sich doch vielleicht eines Tages erweisen, dass auch auf diesem Wege erfolgreiche Resultate zu erzielen sind.

Literatur.

Allerhand, Eine neue Methode zur Färbung des Zentralnervensystems. Neurol. Zentralbl., p. 727, 1897.

Aronson, Über die Anwendung des Galleïns für die Färbung des Zentralnervensystems. Zentralbl. für med. Wissensch. 1890.

— desgl. in Zentralbl. f. allgem. Pathologie etc. Nr. 13, p. 518, 1902.

Askanazy, Bemerkungen zur Marchischen Färbung und Markscheidenfärbung von Weigert. Zentralbl. f. allgem. Path., p. 619, 1897.

Azoulay, Markscheiden- und Nervenzellenfärbung. Neurol. Zentralbl., Nr. 7, 1895.

Benda, Markscheidenfärbung des peripheren Nerven. Neurol. Zentralbl., p. 139, 1903.

— Demonstration von mikroskopischen Präparaten aus der Färbetechnik des Zentralnervensystems. Verhandl. d. Ver. f. innere Med. Jahrg. XX.

Berkley, Die Osmium-Kupfer-Hämatoxylinfärbung. Neurol. Zentralbl. 1892.

Bolton, On the Nature of the Weigert-Pal Method. Journ. of Anat. and Phys., V. XXXII, p. 247, 1898.

— On the range of applicability of certain modifications of the Weigert Pal process. Journ. of. Anat. and Phys., V. XXXIII, p. 292, 1839.

Borchert, Über Markscheidenfärbung bei niederen Wirbeltieren. Verhdlg. der Physiol. Gesellsch. zu Berlin, 25. Mai 1904.

Brodmann, Die Anwendung des Polarisationsmikroskopes auf die Untersuchung degenerierter markhaltiger Nervenfasern. Neurol. Zentralbl., p. 1154, 1900.

— Desgl. Zentralbl. f. Nervenheilk., Bd. XXIV, p. 193, 1901.

— Bemerkungen zur Untersuchung des Nervensystems im polarisierten Lichte. Journ. f. Psychol. u. Neurol., Bd. II, Nr. 5, p. 211, 1903.

Busch, Über eine Färbungsmethode sekundärer Degenerationen des Nervensystems mit Osmiumsäure. Neurol. Zentralbl. Nr. 10, 1898.

Döllken, Weigert-Pal-Färbung sehr junger Gehirne. Zeitschr. f. wiss. Mikrosk, XV, p. 443, 1898.

Ellermann, Untersuchungen über die Markscheidenfärbungen mit Beiträgen zur Chemie der Myelinstoffe. Skandin. Arch. f. Psychologie, Bd. XIV, p. 337, 1903.

Exner, Sitz. Akad. Wiss. Wien, Bd. 73, III. Abt.

Ewald u. Kühne, Neurokeratingerüst. Verh. naturhist. Ver. Heidelberg. N. F. Bd. 1, 1874.

Fränkel, Über eine neue Markscheidenfärbung. Neurol. Zentralbl, Nr. 16, 1903.

— Nach neuer Methode gefärbte Rückenmarksschnitte. Münch. med. Wochenschr., p. 40, 1903.

v. Frey, Eine Goldfärbung des Nervenmarks. Arch. f. Anat. u. Phys. Supplement-Band, 1897.

Heller, Osmierung des Rückenmarks. Berl. klin. Wochenschr., Nr. 50, 1895.

Herrick, Experiments with the Weigert methods. Journ. of comparat Neurol. Vol. VIII, Nr. 1—2, 1898.

Iwanow, Nachfärbung von Präparaten nach Weigert. Wratsch, Nr. 10, 1897.

Kaes, Neue Beobachtungen bei der Weigertfärbung. Münch. med. Wochenschr., Nr. 22, 1902.

Kaplan, Nervenfärbung (Neurokeratin, Markscheide, Axenzylinder). Ein Beitrag zur Kenntnis des Nervensystems. Arch. f. Psych. Band 35. p. 825. 1902.

Kirchgässer, Über das Verhalten der Nervenwurzeln des Rückenmarks bei Hirngeschwülsten, nebst Bemerkungen über die Färbung nach Marchi. Deutsche Zeitschr. f. Nervenheilk. XIII. 1898.

Kölster, Über die Saurefuchsinfärbung degenerierter Nervenfasern. Deutsche Zeitschr. f. Nervenheilk. XX. p. 29. 1901.

Kulschitzky, Über eine neue Methode der Hämatoxylinfärbung. Anat. Anz. IV. 1889.

— Über die Färbung der markhaltigen Nervenfasern in den Schnitten des Zentralnervensystems mit Hämatoxylin und mit Karmin. Anat. Anz. V. p. 519. 1890.

Langley and Anderson, Modification of Marchis method of staining degenerating fibres. Proceed. of the Physiol. Soc. May 13. 1899.

Laslett, Note on a Modification of the Weigert-Pal Method for Paraffin sections. The Lancet. Aug. 6th 1898.

Lissauer, Über die Veränderungen der Clarkeschen Säulen bei Tabes dorsalis. Fortschr. d. Med. 1889.

Marchi u. Algeri, Sulle degenerazioni discendenti consecutive a lesioni della corteccia cerebrale. Rivista speriment. di freniatria. Vol. XI. p. 493.

Marina, Eine Fixationsmethode, bei welcher sowohl die Nisslsche Nervenzellen- als die Weigertsche Markscheidenfärbung gelingt. Neurol. Zentralbl. Nr. 4. 1897.

Mosse, Über Silberimprägnation der Nervenzellen und Markscheiden. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 23. 1900.
— desgl. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 59. p. 401. 1901.

Mott, On Degeneration of neuron. Brit. med. Journ. 23. June. 1900.

Neubauer, Über das Wesen der Osmiumschwärzung. Neurol. Zentralbl. p. 981. 1902.
— desgl. Verhandl. d. Ges. Deutscher Naturf. in Karlsbad. II. H. 2. pag. 18. 1903.

Orr, Method for staining medullated nerve fibres en bloc, a modification of Marchis method. Journ. of Pathol. and Bacteriol. Vol. 6. p. 387. 1900.
— Staining of sheath on nerve fibres. Brit. med. Journ. Nr. 95. 1899. u. Patholog. Soc. of Manchester. (8. III. 99.)

Pal, Ein Beitrag zur Nervenfärbetechnik. Mediz. Jahrb. p. 619. 1886.

Platner, Eine neue Methode zur Darstellung des Neurokeratingerüstes der Nervenfasern. Zeitschr. f. wissensch. Mikr. Bd. VI. p. 186. 1889.

Raimann, Zur Technik der Marchi-Methode. Neurol. Zentralbl. p. 608. 1901.

Redlich, Zur Verwendung der Marchischen Färbung bei pathologischen Präparaten des Nervensystems. Zentralbl. f. Nervenheilkunde 1892.

Robertson, A modification of Hellers method of staining medullated nerve fibres. Brit. med. Journal p. 651. 1897.

Rychlińsky u. Lapińsky, Eine Modifikation der Weigertschen Myelinmethode. Pamiętnik towarzystwe lekarskiego. (Polnisch.)

Sainton, Sur les causes d'erreur dans l'interprétation des résultats fournies par la méthode osmio-chromique (procédé de Marchi). Congrès internat. de Neurol. de Paris. Ref. Revue neurol. 8. p. 725. 1900.

Schaffer, Zur Histotechnik ganz beginnender Strangdegenerationen. Neurologisches Zentralblatt, p. 890, 1898.

Schötter, Über eine neue Methode der Markscheidenfärbung. Zentralbl. f. allg. Pathol. Nr. 8—9. p. 299. 1902.
— Kurze Mitteilung über eine neue Färbungsmethode des Zentralnervensystems. Neurol. Zentralbl. p. 338. 1902.

Spielmayer, Die Fehlerquellen der Marchischen Methode. Zentralbl. f. Nervenheilk. p. 457. 1903.

Starlinger, Zur Marchi-Behandlung. Ein Apparat zur Zerlegung in dünne vollkommen planparallele Scheiben. Zeitschr. f. wissensch. Mikr. XVI. p. 179. 1899.

Stransky, Bemerkungen über die bei Marchifärbung auftretenden artefiziellen Schwärzungen. Neurol. Zentralbl. Nr. 14. p. 658. 1903.

Streeter, Über die Verwendung der Paraffineinbettung bei Markscheidenfärbung. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 62. p. 734. 1903.

Strong, Notes on the technique of Weigerts Method for Staining Medullated Nerve-fibres. The Journ. of compar. Neurol. XIII. Nr. 4. 1903.

Tartuferi, Über eine neue Metallimprägnationsmethode. Ber. über die 31. Vers. der ophthalm.-Ges. (Heidelberg 1903). Wiesbaden 1904. p. 302.

Teljatnik, Zur Anwendung der Marchischen Methode bei Bearbeitung des Zentralnervensystems. Neurolog. Bote, Bd. V. H. 2. 1897.
Weigert, Eine Verbesserung der Hämatoxylinblutlaugensalzmethode für das Zentralnervensystem. Fortschr. der Medizin. Bd. III. p. 236. 1885.
— Zur Markscheidenfärbung. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 42. 1891.
— Beiträge zur Kenntnis der normalen menschlichen Neuroglia. — Festschrift. Frankfurt a. M. 1895.
Wittmaack, Über Markscheidendarstellung und den Nachweis von Markhüllen der Ganglienzellen im Akustikus. Arch. f. Ohrenheilk. Bd. 61. H. 1—2. p. 18. 1904.
Wolters, Drei neue Methoden zur Mark- und Axenzylinderfärbung mittels Hämatoxylinfärbung. Zeitschr. f. wissensch. Mikr. Bd. 7.

C. Die Färbung der Axenzylinder und Neurofibrillen.

So viele Methoden der Axenzylinderdarstellung wir auch seit langem besassen, so machte sich doch dauernd das Bedürfnis nach weiteren besseren geltend, welche es uns erlauben würden, den eigentlichen Neuriten in seinem normalen Bau und im Zustande der Erkrankung zu verfolgen. Die letzten Jahre, und speziell die allerjüngste Zeit, haben uns nun in dieser Hinsicht ein gewaltiges Stück vorwärts gebracht, und dank den Arbeiten von Apáthy, Bethe, Bielschowsky, Ramón y Cajal u. a. verfügen wir heute über mehrere Methoden, welche uns über die Fibrillennatur des Axenzylinders keinerlei Zweifel mehr lassen. Wenn nun wohl hauptsächlich diese neuesten Färbungen künftighin der Forschung dienen werden, so sollen doch die wesentlichsten alten Methoden nicht ganz entthront sein und als für manche Zwecke noch wohl brauchbar hier zunächst angeführt werden.

Die Färbung nach Upson. Methode A.:

1. Härten in Kalium bichrom. Lösung (anfangs 1 %, dann 2 % bis 2,5 %) im Dunkeln! Überhärten ist schädlich.
2. Auswaschen in Alkohol von 50 % (2—3 Tage), der mehrfach zu wechseln, dann in Alkohol von 96 %, bis eine grüne Farbe sich zeigt (nach 2—4 Wochen). Auch dieser Alkohol ist mehrfach zu wechseln.
3. Eventuelle Einbettung; schneiden; die Schnitte werden am besten sofort ohne längeren Alkoholaufenthalt gefärbt in:

   Goldchlorid 1,0
   Aq. dest. 100,0
   Salzsäure 2,0;

   sie werden nach 1—2 Stunden gelb.

4. Abspülen, übertragen in 10 % Kalilauge, welcher kurz vor Gebrauch eine Spur Kalium ferricyanat. beigefügt werden kann (1 Minute).
5. Auswaschen, übertragen in 10 % Kalilauge ½ Minute; abwaschen.
6. Reduzieren in frisch bereiteter Lösung von:
   Acid. sulfuric. 5,0
   3 % Jodtinktur 10—15 gtt.,
   mischen und hinzufügen von Liq. ferri chlorici 1 gtt.; der Schnitt wird rosa.
7. Abwaschen, Alkohol, Nelkenöl, Balsam.

Metallinstrumente sind durch Glas zu ersetzen; die Schnitte halte man im Dunkeln.

Methode B.:

1. Vorbereiten der Schnitte wie bei A.
2. Schnitte kommen in folgende Lösung (für 2 Stunden):
   Salzsäure 2 gtt.
   1 prozentige Goldchloridlösung 5,0
   Gesätt. Vanad-Ammoniumlösung 10 gtt.
3. Kurzes Abspülen, übertragen in folgende frisch bereitete Lösung:
   10 prozentige Kalilauge 5,0,
   Vanad-Ammonium (minimaler Zusatz),
   10 prozentige Kal. permangan. Lösung 10 gtt. (1 Minute).
4. Abspülen, reduzieren in frisch bereiteter Lösung von:
   Zinklösung a 15 gtt.
   Aq. dest. 3,0
   Eisenlösung b 5 gtt.
   Acid. sulfuric. 3,0.

Beim Hinzufügen der Säure entsteht ein dichter Niederschlag, zu gleicher Zeit soll der Schnitt in die jetzt am stärksten sich verhaltende Lösung getan werden; er wird purpur; danach

5. Abwaschen, Alkohol, Öl, Balsam.

Die Zinklösung a stellt man her, indem man zu einer gewissen Menge 3 prozentiger Jodtinkturlösung so viel Zinkchlorid zusetzt, dass eine weiss-gelbliche Farbe entsteht. Lösung b ist wässerige gesättigte Eisenphosphatlösung.

Ausser den Axenzylindern sind auch die Nervenzellen gefärbt.

Upson bemerkt, dass der Erfolg der Färbung bedingt wird durch besondere, fremde Bestandteile der Goldlösung; eine reine Goldchlorid-

lösung, die sorgfältig neutralisiert sei, färbe wenig oder überhaupt nicht, und die mehr oder minder gute Färbung sei abhängig von der Anwesenheit von Salzsäure in der Goldchloridlösung oder einer anderen Verunreinigung; die besten Resultate erhalte man aber durch Hinzufügung von Säuren oder Metallsalzen oder beiden zu der Goldlösung.

Die Färbung nach Gerlach.

1. Härten in Ammonium bichrom. Lösung von anfangs schwacher, dann 2 prozentiger Konzentration.[1])
2. Herstellung kleinster Stückchen mit nochmaliger kurzer Härtung.
3. Schneiden (mit der Hand) in Klemmleber unter Wasser; Alkohol ist zu meiden.
4. Übertragen des Schnittes in eine Lösung von Goldchloridkalium (1,0 : 10000,0), die leicht mit Salzsäure angesäuert ist (12 Stunden).
5. Abwaschen in Salzsäurelösung (2,0 : 3000,0).
6. Übertragen in Lösung von: Salzsäure 1,0. 60 % Alkohol 1000,0. (10 Minuten.)
7. Alkohol, Nelkenöl, Balsam.

Die Methode ist unsicher; an embryonalem Gehirn sind die Resultate vielleicht bessere. Nach Goodall scheint es, als wenn Boll am frischen Hirn von Mäusen, Gerlach an der menschlichen Hirnrinde gute Erfolge gehabt hätte.

Die Färbung nach Freud.

1. Härten in Müllerscher oder Erlitzkyscher Flüssigkeit (eventuell mit nachfolgender Alkoholhärtung).
2. Auswaschen, einbetten, schneiden; färben in 1 prozentiger Goldchloridlösung (3—5 Stunden).
3. Auswaschen der Schnitte, einbringen für 3 Minuten in eine Lösung von:

   Natronlauge 1,0
   Aq. dest. 5,0.
4. Abwaschen; übertragen in 10 prozentige Jodkaliumlösung (5 bis 15 Minuten), wo die Schnitte rot-violett werden.
5. Abwaschen, Alkohol von steigender Konzentration, Xylol, Balsam.

Die Resultate sind wechselnd; in guten Präparaten sieht man die Axenzylinder dunkelrötlichblau bis schwarz gefärbt; die Nervenzellen sind manchmal nicht gefärbt, manchmal deutlich rötlich hervorstechend; nach Freud ist letzteres nur beim Erwachsenen der Fall. — Die Haltbarkeit der Präparate erstreckt sich über viele Monate.

---

[1]) Boll schreibt vor, dass man erst noch schwächere als 1 prozentige Lösung verwende, nach einigen Stunden 1 prozentige Lösung, nach einigen Tagen 2 prozentige Lösung, aber im ganzen nur 8 Tage lang.

Metallinstrumente sind bei der Präparation zu vermeiden und durch Glas zu ersetzen.

Elektiver wird die Färbung, wenn man die Goldchloridlösung mit dem gleichem Volumen von 96 prozentigem Alkohol mischt.[1])

An frischem, noch nicht gehärtetem Material scheint die Färbung am besten zu gelingen (Kahlden).

Die Färbung nach van Gieson.

1. Härten in Müllerscher Flüssigkeit. (Formol oder Alkohol.)
2. Einbetten, Schneiden.
3. Überfärben in Delafields Hämatoxylin (oder anderem Alaunhämatoxylin) 15—60 Minuten.
4. Gründliches Auswaschen in Leitungswasser.
5. Färben $^1/_2$—5 Minuten in einer Mischung von gesättigter Pikrinsäurelösung, mit einigen Tropfen gesättigter Säurefuchsinlösung. (Die Mischung muss dunkelrot erscheinen.)
6. Auswaschen in Leitungswasser; Alkohol, Origanumöl, Balsam.

Die Axenzylinder erscheinen tiefrot, Markscheiden gelb, Glia rötlich, Kerne blau-violett; sklerosierte Partieen intensiv rot.

Man beachte Folgendes: Die Hämatoxylin-überfärbten Schnitte sind möglichst lange in Leitungswasser zu waschen, worin sie bekanntlich infolge der Alkalescenz desselben noch nachdunkeln. Was die eigentliche Farblösung (Fuchsin S — Pikrinsäure) betrifft, so kann man statt des Begriffs dunkelrot sich nach Freeborn an folgende Formel halten:

1 prozentige Lösung von Säurefuchsin 15,0
Gesättigte Pikrinsäure-Lösung } $\overline{aa}$ 50,0.
Wasser }

Auch in dieser Lösung färbt man nur ganz kurze Zeit; es ist die Dauer abhängig

1. von dem Grade der Vorfärbung,
2. von der Zeit, die man die gefärbten Schnitte im Leitungswasser differenzieren lässt; denn das Hämatoxylin tritt in dem Masse wieder deutlicher hervor, als das Fuchsin und die Pikrinsäure durch das Leitungswasser entfernt werden.

Diese ausgezeichnete vielseitige Methode liefert die besten Bilder

[1]) Cohnheim hat die Goldmethode als erster und zwar für die Nerven der Cornea angewendet; die Schnitte kamen in 0,5 prozentige Goldchloridlösung und dann in Wasser mit Zusatz von einigen Tropfen Essigsäure (Salzsäure, Ameisensäure).

an Schnitten, die gut durchgechromt sind, ist aber auch bei Formol- und Alkoholhärtung anwendbar. Durch die Kombination mit Alaunhämatoxylin werden sowohl das Nervenparenchym, als auch Bindegewebe, Gefässe, Blut, Amyloid etc. trefflich gefärbt. Erwähnt sei auch, dass **van Gieson**-Präparate sich ausnehmend gut zur mikrophotographischen Aufnahme eignen. Die Methode besonders am Nervensystem verwandt zu haben, ist das grosse Verdienst von Paul Ernst.

Für die Hämatomyelieen speziell hat Minor diese Methode in der Weise modifiziert, dass er die Vorfärbung mit Hämatoxylin gänzlich weglässt und die Farblösung für jedes R.-M. derart „abstimmt", dass die weisse Substanz ganz gelb, die graue rosa, Häute und Gefässe hellrot, Blut braun gefärbt werden. Dies erreicht M. durch vorsichtiges Hinzugiessen konzentrierter Pikrinsäurelösung zu der ursprünglichen Lösung (oder auch durch Überfärbung des Schnittes in der üblichen van Giesonschen Lösung mit folgender Differenzierung in gesättigter Pikrinsäurelösung bis zur erwünschten Farbe).

Zosin meint, dass auch die Färbung mit Magentarot nach Härtung der Stücke in Müllers Flüssigkeit dieselben Resultate wie van Giesons Methode gibt.

Sein Verfahren ist folgendes:

1. Härten in Müllers Flüssigkeit, Zelloidineinbettung, Schneiden.
2. Färben mit 1prozentigem Magentarot (20 Minuten bis 1 Stunde). Schnitte werden rot.
3. Abspülen in Wasser, dann in Alcoh. absol., bis keine Farbwolken mehr abgehen und die graue Substanz durch rote Färbung sich von der gelben Marksubstanz deutlich abgegrenzt hat.
4. Xylol, Kanadabalsam.

Die Präparate bieten beinahe denselben Anblick, wie die nach van Gieson hergestellten, Markscheide gelb, Axenzylinder braun, Kerne braunrot, sklerotisches Gewebe und Glia violettrot, Ganglienzellen rot.

Die Färbung der Axenzylinder nach Stroebe.

1. Härten in Müllerscher Flüssigkeit.
2. Alkohol, Celloidin.
3. Färben in gesättigter wässeriger Anilinblaulösung; der Schnitt wird blauschwarz. (15 Minuten bis 1 Stunde.)
4. Abspülen, Differenzieren in Alcoh. absol., dem 20—30 Tropfen eines 1prozentigen Ätzkali-Alkohols [1]) zugesetzt sind, bis der Schnitt hellbraunrot und durchscheinend ist (1 bis mehrere Minuten).
5. Auswaschen; der Schnitt wird hellblau.

[1]) Ätzkali-Alkohol wird hergestellt, indem man 100 ccm Alkohol mit 1 gr Kal. caust. 24 Std. stehen lässt und dann filtriert.

6. Verdünnte Safranin-Lösung (15—30 Min.) als Kontrastfärbung.
7. Alcohol absol., Xylol, Balsam.

Die Axenzylinder werden hierbei ebenso wie die Gliafasern konstant blau gefärbt bei safranroter Gegenfärbung der Markscheide, des Protoplasmas, der Grundsubstanz und Zellkerne; letztere weisen manchmal auch blaue Färbung auf.

Absolute Sicherheit ist der Färbung nicht zuzusprechen.

Die Färbung nach Mallory.

1. Färbung der Schnitte 20 Minuten bis 1 Stunde in einer einige Wochen lang dem Sonnenlichte ausgesetzten und vor dem Gebrauch filtrierten Lösung von

Phosphor-Molybdänsäure (10prozentig) .	10,0
Hämatoxylin	1,75
Aq. dest.	200,0
Acid. carbol. crystall.	5,0

2. Auswaschen in 2—3mal gewechseltem 50prozentigen Alkohol (5—20 Minuten),
3. Alkohol, Xylol, Balsam.

Die Methode ist leicht und sicher, doch dürfen die gefärbten Schnitte nicht zu lange im absoluten Alkohol verweilen. Die Färbekraft der Lösung nimmt allmählich stark zu, so dass man sie späterhin noch mit Aq. dest. verdünnen kann. Die Axenzylinder erscheinen tiefblau, desgl. die Glia; nach Stroebes Angaben eignet sich sogar diese Methode besonders für die Darstellung der Glia in Gliomen.

Die Eisenhämatoxylinmethode nach Benda.

1. Härten in Müllerscher Flüssigkeit (oder einer anderen fixierenden Flüssigkeit).
2. Einbetten, schneiden.
3. Beizen der Schnitte während 24 Stunden in:

Liq. ferri sulfur. oxydati } aa.
Aq. dest. } resp. 1 : 2.

4. Sorgfältiges Auswaschen zuerst in Aq. dest., dann in gewöhnlichem Wasser.
5. Färben in 1 prozentiger wässeriger Hämatoxylinlösung, bis die Schnitte schwarz sind.
6. Differenzieren in 30prozentiger Essigsäure; Weiterbehandlung wie üblich.

Die Färbung nach Schmaus

1. mit Urancarmin, ohne dass das Zelloidin besonders gefärbt wird.
   1 gr karminsaures Natron wird mit 0,5 gr Uranum nitricum verrieben, 1/2 St. mit 100,0 Aqua gekocht, nach dem Erkalten filtriert. Die Schnitte des Rückenmarkes färben sich in 15—20 Minuten. —
   Härtung in Müllerscher Flüssigkeit; kein Auswässern.
2. Auch das Black-blue (Grübler) ist nach Schmaus für Axenzylinder zu empfehlen. 0,25 % Lösung in 50 % Alkohol mit etwas Pikrinsäure-Zusatz. Färben 1 Stunde. Auswaschen in Aqua, Entwässern in Alkohol. Kupferung ist gestattet. —

Rawitz empfiehlt das Coeruleïn S der Höchster Farbwerke, einen Teerfarbstoff, als vollkommenen Ersatz für das ammoniakalische Karmin, d. h. zur Darstellung der Axenzylinder, und gibt als geeignetes Rezept zur Färbung folgende Lösung an:

Coeruleïn S	0,1
Weinsaures Antimonkalium . . .	1,0
Aq. dest.	100,0.

Man löst zunächst das weinsaure Antimonkalium in lauwarmem Wasser, gibt dann den Farbstoff zu und kocht die Flüssigkeit auf dem Sandbade. Nach dem Erkalten giesst man von dem geringen Bodensatze, der sich im Glaskolben gebildet hat, vorsichtig ab; die so erhaltene dunkelgrüne Farblösung kann man monatelang aufheben. Zur Färbung verdünnt man einen Teil der Stammflüssigkeit mit dem 10—20fachen Vol. Aq. dest. — Die Vorbehandlung des Materials ist gleichgültig. Die Schnitte bleiben 24—48 Stunden im Brutofen in der Farbe, werden ausgewaschen, in 96prozentigen Alkohol übertragen, aufgehellt und montiert. Rawitz empfiehlt das Coeruleïn nur für Rückenmarksschnitte; die Glia ist blassgrün, Nervenzellen und Axenzylinder dunkelgrün gefärbt, der Kern der Zellen bleibt farblos.

Die Färbung nach Paladino.

1. Härten in Müllerscher Flüssigkeit (möglichst dünne Stücke).
2. Auswaschen, entwässern in 96prozentigem resp. absolutem Alkohol.
3. Kochen der Stückchen nacheinander in: Alcoh. absol. und Benzol, dann in Benzol, zuletzt in absolutem Alkohol (je 1 Stunde).
4. Einlegen in Chlorpalladiumlösung (1,0 : 1000,0 mit Zusatz einiger Tropfen Salzsäure) 4—8 Tage.
5. Übertragen in eine 4prozentige Jodkaliumlösung (möglichst geringe Menge, da sonst wieder das Jodpalladium gelöst wird) 1—4 Tage.
6. Alkohol (80 % und 96 %). Einbetten (kein Paraffin, da sonst die Färbung misslingt).
7. Schneiden, Alkohol, Öl, Balsam.

Der Schnitt sieht nun gelbbraun oder dunkelbraun aus; gefärbt sind die Axenzylinder, aber auch die Neuroglia und die Markscheiden.

Paladino glaubt mit dieser Methode auch gewisse Beziehungen zwischen Neuroglia und Markscheiden dargestellt zu haben, derart, dass letztere eine Fortsetzung der Neuroglia seien und auch Neurogliazellen enthalten.

Die Färbung mit Anilin-Blue-black.

1. Härten in Müller (mit nachfolgendem Alkohol) oder in Sublimat (mit nachfolgendem Alkohol), einbetten, schneiden.
2. Färben in 0,25prozentiger wässeriger Lösung von Anilin-Blue-black (event. mit etwas Alkoholzusatz) (englisches Präparat!) 1 Stunde.
3. Auswaschen, Alkohol, Kreosot oder Origanumöl, Balsam.

Axenzylinder und Nervenzellkerne tiefblau gefärbt, Gliakerne, Nervenzellen blaugrau.

Chromhärtung ergibt bessere Resultate als Sublimat, welches aber im allgemeinen schnellere Färbung gestattet.

Mit Indulin und Anilinblau ist eine ähnliche Färbung zu erzielen.

Die Färbung mit Nigrosin.

1. Härten in Müllerscher Flüssigkeit; einbetten, schneiden.
2. Färben in konzentrierter wässeriger Nigrosinlösung (10 Minuten).
3. Auswaschen in Wasser und Alkohol $\overline{aa}$; Alkohol, Origanumöl, Balsam.

Die Methode gibt bei ihrer Einfachheit zugleich sehr gute Übersichtsbilder und konstante Resultate.

Die Färbung nach Sahli.

1. Härten in Müllerscher Flüssigkeit (möglichst lange). Auswaschen (wenige Minuten), einbetten, schneiden.
2. Färben (mehrere Stunden) in folgender Lösung:

Gesättigte wässerige Methylenblaulösung	24,0
5 prozentige Boraxlösung	16,0
Aq. dest.	40,0

3. Auswaschen in Wasser, dann in Alkohol, bis die graue Substanz deutlich von der weissen sich abhebt, Zedernöl, Balsam.

Die Axenzylinder und Gliakerne erscheinen tiefblau. Nervenzellen grünlich-blau, die Grundsubstanz hellblau.

Auch hier wie bei den meisten Anilinfarben tritt leicht eine zu starke Entfärbung durch den Alkohol ein, daher der Schnitt möglichst bald in das Zedernöl kommen muss. — Die Methode weist auch eventuell vorhandene Bakterien gut nach.

Strähuber gibt zur Färbung des Axenzylinders folgende Methode an:

1. Fixation (beliebig, exkl. Alkohol).
2. Beizung 5 Tage in Weigerts Markscheidenbeize:

Doppeltchroms. Kal. . . .	5,0
Chromalaun	2,0
Aq. dest.	100,0

3. Alkohol, Zelloidineinbettung.
4. Färbung der Schnitte ca. 12 Stunden in konzentrierter wässeriger Anilinblaulösung (Grübler).
5. Differenzierung nach Pal oder in Wasser, dem einige Tropfen unterchlorigsaures Natron zugesetzt sind.
6. Wasser, 96prozentig. Alkohol.
7. Karbolxylol, Kanadabalsam.

Zwischen 3 und 4 kann nach Bedarf Färbung der Schnitte mit Weigerts Hämatoxylin oder, der besseren Kontrastfarbe wegen, mit konzentrierter alkoholischer Eosinlösung auf 24 Stunden ohne nachherige Differenzierung angewendet werden. Die Differenzierung erfolgt zusammen mit der Axenzylinderdifferenzierung.

Ob die Färbung eine elektive Axenzylinderfärbung ist, beantwortet Strähuber selbst mit Ja und Nein; denn die Fibrillen werden nicht gefärbt, aber der Bestandteil des Axenzylinders, der meist seine Hauptmasse ausmacht. Die Methode soll hauptsächlich dem Pathologen zu statten kommen.

Ferner sei noch eine kürzlich publizierte **Methode von Ellermann** erwähnt:

1. Fixierung in { Äther . . . 3 T. / Aldehyd . . 1 T. } 4—5 Tage.
2. Alcohol absol. 24 Stunden. Zelloidineinbettung. Schneiden.
3. Schnitte 24 Stunden in 5prozentiger Kal. bichrom.-Lösung bei 37° C.
4. Färben mit Kultschitzkys Hämatoxylin 24 Stunden bei 37° C., oder einige Minuten bei ca. Siedehitze.
5. Differenzieren nach Pal.
6. Nachfärben mit Eosin.

Axenzylinder und Nervenzellen sind schwarz, Markscheiden und Gliafasern roth, Kerne ungefärbt. Schnitte müssen dünn sein, da sonst das Bindegewebe nicht entfärbt wird. — Für pathologisches Material ist die Methode noch nicht erprobt. Der Äther ist das Wesentliche bei der Fixierung: das Aldehyd dient nur, um zu starke Schrumpfung zu verhindern. Das Färbungsprinzip ist sonst dasselbe wie bei Weigerts Markscheidenfärbung; alle Markscheidenfärbungen (Osmium-Pyrogallussäure, Eisenchlorid-Tannin, Methylenblau) geben nach Aldehyd-Ätherfixierung Axenzylinderfärbung!

Fajersztajn gibt zwei verschiedene Methoden zur Darstellung der Axenzylinder an, von welchen die Hämatoxylinmethode der Silberimprägnationsmethode in bezug auf »pathologische« Darstellungen überlegen ist. Die letztere gehört (wie wohl die meisten derartigen Methoden!) mehr ins Gebiet der normalen Histologie.

Der Vorgang der ersten Methode ist folgender:

1. Härtung in Formaldehyd (5—10 %) (Tage—Monate), eventuell selbst nach Chrom- resp. Sublimatfixation.
2. Schneiden auf dem Gefriermikrotom (also ohne Alkohol-Äther-Behandlung).
3. Beizen in Chromsäure (5—24 Stunden) (nicht Chromsalze oder Chromalaun!).
4. Abwaschen in Aq. dest. (ca. 10 Minuten; eventuell in warmem Wasser).
5. Färben in Weigerts oder Kulschitzkys Hämatoxylinlösung; bei Anwendung sekundärer Beize (Müller- oder Kupferazetat) ½—2 Stunden, ohne dieselbe 2—6 Stunden.
6. Differenzieren nach Pal. — Querschnitte entfärben sich leichter als Längsschnitte.
7. Einbetten.

Makroskopisch sind die Bilder den Weigert-Palschen gleich; mikroskopisch aber zeigen sich meist nur die Axenzylinder gefärbt, indessen ohne Strukturdetails.

In der Regel ergibt also diese Methode ohne Alkohol-Äthereinwirkung bei nachfolgender Chromsäurebeize die Bildung des Chromlackes in den Axenzylindern, nicht in den Markscheiden.

Von Mängeln hebt F. folgende hervor: Die Elektivität ist nicht stets vorhanden, es sind dickere Neurogliazüge oft mitgefärbt. Ferner entfärbt sich manchmal ein Teil der Markscheiden nicht vollkommen, ja öfters kommt eine fast exklusive Markscheidenfärbung zustande. Weiter färben sich gewisse Schnittpartien, besonders der weissen Substanz, hin und wieder sehr schwach, was F. auf Überschuss an Chromsäure zurückführt.

Die besten Resultate erhielt F. an der Spina und den peripheren Nerven, weniger gute an Grosshirn- und Kleinhirnrinde.

Die **Silberimprägnationsmethode Fajersztajns** soll ein eklatantes Mittel zur elektiven Färbung der Axenzylinder darstellen und beruht auf der in der Bildung eines Silberspiegels bestehenden Reaktion.

1. Härtung in Formalin (5—10 %) (oder auch Chrom).
2. Schneiden mit Gefriermikrotom.
3. Silberbad a) Herstellung der Mutterlösung: Zu frischer 2prozentiger Ag. NO_3-Lösung wird tropfenweise NH_3 zugesetzt, bis keine Färbung mehr vorhanden. Versetzen mit vorrätiger

Ag. NO_3-Lösung, bis gelblicher Niederschlag entsteht, letzterer wird mit analytischem Filter abfiltriert.

b) Alkalizusatz, geschieht in der sub c) angegebenen Weise.

c) Imprägnation. Man hält Tropffläschchen von 50 ccm. mit folgenden Reagentien gefüllt: 1. Liq. Ammon. (10 %), 2. 1 % NH_3-Lösung, 3. 0,3 % NaOH-Lösung, 4. 10 % Barytwasser. Mit der Mutterlösung a) werden 4 kleine Schälchen gefüllt: 1 enthält reine Lösung, 2 mit Zusatz von 1—2 Tropfen von dünnem NH_3, 3 mit Zusatz von 2—3 Tropfen von dünnem NH_3 + 1—2 Tropfen einer Alkalilösung, 4 mit Zusatz von 1 Tropfen 10prozentiger NH_3 und 2—5 Tropfen einer Alkalilösung. — In jedes Schälchen werden je einige Schnitte direkt aus destill. Wasser übertragen und 5—20 Min. in der Silberlösung gebadet.

4. Reduktion: Schnitte kommen direkt jetzt in 12,5 % Formalin (real: 5 %!), welches momentan und energischer als andere Aldehyde reduziert. Alle Axenzylinder treten auf diffus gelblichem Grunde braunschwarz hervor. Imprägnation und Reduktion kann eventuell 1—2mal wiederholt werden.
5. Differenzierung und Fixierung des Silberniederschlags (bei guten Formalpräparaten weniger nötig als bei chromierten). Schnitte bleiben nach Abspülen 12—24 Stunden (im Dunkeln) in 96prozentigem Alkohol, dem 1—3 Tropfen 0,3prozentiger Chlorgoldlösung zugesetzt wurden. Der Schnitt wird rosaviolett, die Färbung der Axenzylinder noch dunkler bis pechschwarz. — Statt des Vergoldens ist auch Verplatinieren mit $PtCl_4$ verwendbar, da letzteres auch eine Differenzierung ermöglicht.
6. Nach der Au.- und Pt.-Fixierung Aufheben der Schnitte in Kanadabalsam. —

Die Methode lässt sich nach F. auch bei Degenerationen versuchen; indessen ist sie sehr launenhaft. — Eine andere sonst gut verwendbare Silberverbindungslösung von Ag_2O in NH_3 — wird wohl wegen leichter Zersetzbarkeit wie grosser Explosionsgefahr besser nicht benutzt.

Auch die **Methode nach Kaplan** sei noch angeführt:

1. Härtung in Müllerscher Flüssigkeit (3 Monate und länger).
2. Alkoholnachhärtung.
3. Einbettung in Zelloidin oder Paraffin.

4. Färbung in 10prozentiger, frisch bereiteter wässeriger Lösung von Anthracen-Eisengallustinte, 3 Tage am besten im Brütofen.
5. Kurzes Auswaschen in Wasser.
6. Differenzieren nach Pal (mehrfach).
7. Kurzes Auswaschen in Wasser, Alkohol, Karbolxylol, Xylolkolophonium.

Während Kaplan auf diese Weise die Axenzylinder elektiv zu färben suchte, sollte eine weitere Methode das Ewald-Kühnesche Neurokeratingerüst elektiv darstellen.

Die Methode nach Kaplan zur Darstellung des Neurokeratingerüstes.

1. Fixierung in Formol-Müller (10 : 100) 1—2 Tage je nach der Grösse.
2. Härtung und Beizung in Müller (monatelang je nach Grösse).
3. Alkoholhärtung.
4. Einbetten (Zelloidin oder Paraffin), Schneiden (möglichst bald!).
5. Färben in $^1/_3$ prozentigem Säurefuchsin (1 bis mehrere Tage im Brütofen).
6. Schnitte in Wasser (nicht in Alkohol!) (eventueller Cl-Zusatz macht die Färbung noch intensiver).
7. Differenzieren: Die in Wasser abgespülten Schnitte kommen flüchtig in Kal. permangan. ($^1/_3$ %), Wasser und schweflige Säure in statu nascendi (Kal. sulfuros. 4 : 200, Oxalsäure 4 : 200 frisch gemengt), Wasser, dann diese ganze 4fache Prozedur noch einmal bis zur deutlichen Differenzierung von grauer und weisser Substanz wiederholen.
8. Wasser (eventuell mit Cl-Zusatz); eventuell Kontrastfärbung mit dünnem Nigrosin oder Anthraceneisengallustinte.
9. Kurzes Entwässern (95 % Alkohol).
10. Karbolxylol (abtrocknen!).
11. Xylolkolophonium (2 : 1).

Im Gegensatz zur Weigertschen Methode handelt es sich hier anscheinend um eine Tinktion ohne Lackbildung; daher ist auch eine Blockfärbung möglich:

1. Fixierung in Formol-Müller (10 : 100) + 1,0 Fuchsin-S. (1—2 Tage).
2. Weitere Härtung etc. in Müller, mit gleichem Zusatz von 1 % Fuchsin-S.

In degenerierten Partien findet sich an Stelle normaler Bilder Unregelmässigkeit, körnige Anordnung, stellenweise Fehlen der sonst gefärbten Substanz.

Die Methoden zur Darstellung der Neurofibrillen.[1]

Nachdem Max Schultze die fibrilläre Struktur der Nervenfasern (und Nervenzellen) aus ungefärbten Präparaten mittelst Behandlung frischen Materials mit Jodserum erschlossen und Kupffer als erster Neurofibrillen färberisch (Säurefuchsin nach Osmiumsäure-Fixation) dargestellt hatte (1883), machte sich das Verlangen nach spezifischen Neurofibrillenmethoden immer stärker geltend. In schneller Aufeinanderfolge, ja fast gleichzeitig, hat uns nun die neueste Epoche eine Reihe solcher Methoden geschenkt, deren Verwendbarkeit freilich verschieden zu bewerten ist.[2])

Der prachtvollen Bilder wegen, die sie (wenigstens in des Autors Hand) gibt, sei an erster Stelle angeführt:

Die Methode der Nachvergoldung nach Apáthy.

1. Fixation in Sublimat (wässerig konzentriert) oder Sublimatalkohol (16—24 Stunden).
2. Auswaschen, Entfernen des Sublimats in wässeriger Jodjodkaliumlösung.
3. Übertragen direkt in 95prozentigen Alkohol (8—12 Stunden), danach ebenso lange in alkoholische Jodjodkaliumlösung (1 % J.K., ½ % J.).
4. Entwässern in Alcoh. absol. Falls alles Jod entfernt war, empfiehlt es sich, die Schnitte vor dem Übertragen in die Goldlösung kurze Zeit in verdünnte Jodlösung zu bringen.
5. Paraffineinbettung (mit Chloroform als Zwischenmedium) oder Zelloidineinbettung; im letzteren Falle werden die Blöcke in Glyzerinleim aufgehoben.
6. Aufkleben der Paraffinschnitte (ca. 10 μ dick) mit Wasser oder Eiweisswasser.

---

[1]) Vergl. Bethe, Artikel „Nervenfasern und -zellen" in Encyclop. der mikrosk. Technik; Bielschowsky, „Die Silberimprägnation der Neurofibrillen", Journ. f. Psychol. u. Neurol., Bd. III; v. Lenhossék, „Cajals neue Fibrillenmethode", Neurol. Zentralbl. 1904.

[2]) Eine Methode Donaggios konnte leider nicht mehr Prüfung und Aufnahme nach Fertigstellung des Buches finden.

7. Reines Chloroform, Alkohol, Aq. dest. (2—6 Stunden).
8. Übertragen in eine Glastube mit einer 1 prozentigen Lösung von Aurum chloratum flavum (Merk) (auf 12—24 Stunden).
9. Schnelles Abspülen, die Objektträger mit den Schnitten schräg nach unten in eine Glastube gestellt, welche eine 1 prozentige Lösung von Acid. formic. enthält. Die Tuben werden 6—8 Stunden allseitig gut beleuchtet, wobei aber die Temperatur nicht hoch steigen darf. (1 Tube für jeden Objektträger.)
10. Abwaschen (Abwischen des Goldniederschlags auf der Rückseite), Alkohol, Chloroform, Kanadabalsam.

Gut gelungene Präparate zeigen die Neurofibrillen tiefschwarz oder dunkelblau auf farblosem (oder rosa) Grunde. Leider aber eignet sich die Methode bisher nur für Wirbellose (Nematoden, Hirudineen etc.), und auch da ist es noch niemandem gelungen, solche prachtvollen Resultate zu erzielen, wie Apáthy selbst sie erhielt. Nach Apáthys Angaben ist es wesentlich, beim Belichten eine bestimmte Energiekonstante zu treffen, die in einem bestimmten Verhältnis zwischen Licht und Wärme besteht. Zu starkes Erwärmen während der Belichtung ist schädlich; im Winter soll man daher die Präparate im direkten Sonnenlicht aufstellen, im Sommer ist es zweckmässiger, nur helles Tageslicht anzuwenden, die Temperatur möge 20° C. nicht überschreiten.

Die Lücke, welche Apáthys auf die Wirbellosen beschränkte Methode lässt, füllt das Molybdänverfahren Bethes aus, insofern, als damit ausser an Wirbellosen auch an Wirbeltieren gut differenzierte Neurofibrillenpräparate zu erzielen sind. Das Verfahren beruht darauf, dass die Neurofibrillen grosse Mengen Molybdänsalz aufzuspeichern vermögen, und dass diese (nach dem Waschen) durch einen basischen Farbstoff optisch sichtbar gemacht werden, indem nämlich die Molybdänsäure mit dem basischen Farbstoff eine unlösliche Verbindung eingeht. Die Färbbarkeit der Nissl-Schollen in den Zellen wird unterdrückt, indem man die Blöcke mit Alkalien (Ammoniak) auszieht. — Für pathologische Zwecke ist die Methode noch nicht verwendbar. Folgendes ist ihr Modus:

Das Molybdänverfahren nach Bethe zur Darstellung der Neurofibrillen und Golginetze.

1. Frisches Material in dünnen Scheiben (4—10 mm) auf Fliesspapier in HNO_3 von 3—7,5 % gebracht (24 Stunden). Temperatur der HNO_3 nicht über 20° C.

   Stärkere Nitrierung (7,5 %) lässt mehr die Golginetze, schwächere (3—5 %) mehr die Fibrillenbilder hervortreten.

2. Direktes Übertragen in 96prozentigen Alkohol für 12—24 Stunden (mehrere Tage).
3. Ausziehen mit Ammoniak-Alkohol. Übertragen der Blöcke in eine Mischung von:

Ammoniak (spez. Gew. 0,95—0,96) .	1 T.
Wasser	3 T.
Alkohol (96 %)	8 T.

dann noch eventuell auf einige Stunden in Alkohol.
4. Ausziehen mit Salzsäure-Alkohol.

Salzsäure, konzentr. (spez. Gew. 1,18 = 37 %)	1 T.
Wasser	3 T.
Alkohol (96 %)	8—12 T.

In beiden Fällen (C, D) Temperatur nicht über 20°. — Dann wieder Alkohol (10—24 Stunden).
5. Übertragen in Wasser (2—6 Stunden).
6. Molybdänieren. Blöcke kommen in 4prozentige Lösung von Ammon. molybdän. (24 Stunden). Temperatur nicht über 30°.
7. Einbetten. Kurzes Abspülen in Aq. dest., übertragen in Alkohol (96 %) 10—24 Stunden, ebenso in Alcoh. absol. — Xylol (Toluol, Chloroform), Paraffineinbettung.
8. Schneiden. Aufkleben der Schnitte mit Mayers Eiweissglyzerin; beste Dicke = 10 μ. Xylol, Alkohol, Aq. dest. (1/2—1 Minute).
9. Differenzierung und Färbung. Erstere muss für jeden Block und jede Zellart ausprobiert werden. Abspritzen des Objektträgers mit Aq. dest., Trockenwischen an Rändern und Unterseite, Bedecken der Oberfläche mit 1—1,5 ccm Aq. und Einlegen in Wärmeschrank (55—60° C.) für 2—12 Minuten. Abgiessen der Wasserschicht, nochmals Abspülen, Trocknen an Rändern und Aufspritzen von Toluidinblaulösung (1,0 : 3000,0).

   Der Objektträger bleibt 10 Minuten im Ofen. Dann Abspülen des Farbstoffes, Übertragen in 96prozentigen Alkohol (wobei sich der nicht an Molybdän gebundene Farbstoff mit blaugrüner Farbe löst), nach 3/4—2 Minuten in Alcoh. absol., Xylol, Kanadabalsam (beides wasserfrei!). Gut differenzierte Präparate sehen violett, nicht blau aus. Beste Differenzierungszeit für Gehirn sind 2—6, für Medulla 3—7, für Spina 5—10 Minuten.

Durch die Methode der Molybdänierung ist nach Angabe Bethes die seinerzeit (d. h. vor wenigen Jahren noch) heuristisch sehr wertvolle Kupfermethode Beckers als überholt zu betrachten; diese Methode ist übrigens vom Autor nicht publiziert worden, da Becker (wie Bethe mitteilt) die Existenz von Fibrillen durch sie nicht für sicher bewiesen hielt.

Zu den ebenfalls nicht zuverlässigen und für pathologische Forschungen unbrauchbaren Methoden ist auch die Eisenimprägnation S. Meyers zu zählen, die aber doch ihrer relativen Einfachheit wegen und der Vollständigkeit halber hier angeführt sei.

Die Eisenimprägnation der Neurofibrillen nach Semi Meyer.

1. Fixation in 10 % Formalinlösung (24 Stunden, nicht zu kleine Stücke).
2. Übertragen in $2^1/_2$ % Ferrocyankaliumlösung (8—20 Tage).
3. Übertragen in 10 % Eisenalaun (2—4 Tage).
4. Auswaschen (einige Stunden), Alcoh. absol. (2 Tage), Xylol (2 Stunden), Paraffin (2—4 Stunden).
5. Aufkleben der Schnitte von 10—60 μ mit Eiweissglyzerin, Xylol, Kanadabalsam (bei eventuellem Nachfärben sind Alkalien zu vermeiden, da sie das Berliner Blau sofort zerstören).

Weit überlegen an Sicherheit, Brauchbarkeit und Einfachheit sind nun die Methoden von M. Bielschowsky und Ramón y Cajal, die bestimmt scheinen, in Zukunft eine grosse Rolle zu spielen.

Die Silberimprägnation der Neurofibrillen nach Bielschowsky.

Zu unterscheiden ist

A) Die Imprägnation der Gefrierschnitte.
B) Die Imprägnation ganzer Blöcke.

Verfahren A) gibt die schönsten Resultate.

A) Die Silberimprägnation der Gefrierschnitte.

1. Fixieren in 12prozentiger Formollösung (möglichst säurefreies Formol!) 1 bis mehrere Tage.
2. Die möglichst dünnen Blöcke kommen in Aq. dest. auf einige Stunden.
3. Die Gefrierschnitte kommen in Aq. dest., von da in 2prozentige Lösung von Argent. nitr. auf 24 Stunden. (Bräunlicher Farbenton, Myelinfärbung.)
4. Durchziehen durch Aq. dest. und übertragen in frisch bereitete Lösung von:

   2prozentige Argent. nitr.-Lösung . 20 ccm,
   40prozentige Natronlauge . . . 2—3 gtt.;

   hierbei fällt schwarzbraunes Silberoxyd Ag_2O aus. Tropfen-

weises Hinzusetzen von Ammoniak (umrühren mit Glasstab), bis der Niederschlag gelöst ist. [Es bildet sich hierbei Silberoxydammoniak Ag_2 O_2 (NH_3) und Silberdiammoniumnitrat N (NH_4) AgH_2 NO_3.] Die Schnitte bleiben darin 2—30 Minuten je nach der Dicke.

5. Durchziehen durch Aq. dest., Übertragen in 20prozentige Formollösung (mit Leitungswasser herzustellen) zwecks Reduktion (12—24 Stunden).
6. Auswaschen. Vergolden der braungefärbten Schnitte zur Erzielung von Dauerpräparaten in neutralem oder schwach saurem Goldbade: 2—3 gtt. einer 1prozentigen Goldchloridlösung auf 10 ccm Aq. dest., eventuell mit Eisessig (2—3 gtt.) anzusäuern (ca. 10 Minuten). Grundton wird rötlich violett.
7. Entfernung des nicht genügend reduzierten Silbers in 5prozentiger Lösung von Natriumthiosulfat (Fixiernatron), der bei Verwendung saurer Goldbäder etwas saures schwefelsaures Natron (1 gtt. auf 10 ccm Aq.) zugesetzt wird. (Dauer ca. $^1/_2$ Minute.)
8. Gründliches Auswaschen in Aq. dest., Alkohol, Karbolxylol, Kanadabalsam.

Alle Manipulationen sind mit Glasinstrumenten vorzunehmen.

B) Die Silberimprägnation ganzer Blöcke.

1. Fixation dünnster Blöcke in 12prozentiger Formollösung (1 bis mehrere Tage).
2. Übertragen in 2prozentige Argent. nitr.-Lösung (1—8 Tage).
3. Übertragen in ammoniakalische Silberlösung (Prozedur 4 wie oben) ($^1/_2$—6 Stunden).
4. Durchziehen durch Aq. dest., Reduktion in 20prozentiger Formollösung (12 Stunden bis einige Wochen).
5. Schnelles Entwässern und Einbetten in Paraffin oder Zelloidin.

Paraffinblöcke sind unbegrenzt haltbar, Zelloidinblöcke sind aber bald zu schneiden. Paraffinschnitte werden mit Eiweiss aufgeklebt und wie oben vergoldet und fixiert, Zelloidinschnitte werden direkt wie Gefrierschnitte weiter behandelt.

Alkohol, Äther, Xylol, Chloroform greifen die Reduktionsprodukte des Silbers leicht an, daher ergibt eingebettetes Material weniger sichere Resultate als Gefriermaterial.

Statt des Ammoniaks verwendet und empfiehlt Bielschowsky jetzt das Äthylendiamin C_2 H_4 $(NH_2)_2$, einen geruchlosen Körper

von basischem Charakter, der mit salpetersaurem Silber und Silberoxyd Verbindungen eingeht, welche im Überschuss von ihm löslich sind.

Die hauptsächliche Reaktion der Methode Bielschowskys ist ein Reduktionsvorgang, welcher auf der Neigung der Aldehyde beruht, sich zu den entsprechenden Säuren zu oxydieren. (Formaldehyd zu Ameisensäure etc.)

Die Methode stellt die Neurofibrillen nicht nur des Axenzylinders, sondern auch der Nervenzelle dar, und ist nicht etwa nur für die normale, sondern besonders auch für die pathologische Histologie des Nervensystems von offenbar grossem Werte; gerade in letzter Hinsicht hat das Verfahren bereits zu einwandfreien Ergebnissen geführt. Es sei hier deshalb auch bemerkt, dass die sogenannten elektiven Axenzylinderfärbungen von Kaplan, Strähuber, Fajersztajn — (die Methode des letzteren beruht übrigens auf der gleichen chemischen Grundlage wie bei Bielschowsky) — den Axenzylinder ausschiesslich dort tingieren, wo er von einer Markscheide umhüllt ist: sie färben eine bestimmte Kittsubstanz, welche chemisch und histogenetisch der Markscheide sehr nahe steht und Myeloaxostroma (Kaplan) resp. Axochromatenin (Strähuber) benannt worden ist. Bielschoswky hat mit seiner Methode marklose Nervenfasern an Orten, wo sie bisher nicht gesehen wurden, bei verschiedenen Prozessen gefunden. (Sclerosis multiplex, Myelitis disseminata, atrophischer Opticus bei Glaucom, Rückenmarksnarben, Gliome etc.) —

Von grosser Bedeutung ist ferner die

Methode der Neurofibrillenfärbung nach Ramón y Cajal.

1. Kleine Stücke (3—4 mm dick) bleiben bei 35—40° C. 4 Tage (und mehr) in Argentum nitr.-Lösung von 1 %—6 % (je nach verlangtem Resultat).
2. Die braunen Stücke werden 1—2 Minuten in Aq. dest. ausgewaschen.
3. Übertragen für 24 Stunden in eine Lösung von: Acid. pyrogallic. 1,0, Formol (käufliches!) 5—10,0, Aq. dest. 100,0.
4. Auswaschen in Aq. dest., Härten in Alkohol (95—99,8 %).
5. Einbetten in Zelloidin oder Paraffin, Schneiden (möglichst dünn), Aufkleben.
6. Eventuell: Vergolden (v. pag. 132).

Die Neurofibrillen heben sich auf gelbem Grunde dunkelbraun

ab; die Betheschen gröberen Fibrillen wie die ein feines Netzwerk bildenden »sekundären Fibrillen« erscheinen dabei deutlich. —

Im allgemeinen gebraucht Cajal die 3 % Argentum-Lösung, besonders bei geringem Volumen der Stücke, die 6 %-Lösung bei grösseren Stückchen. Zur Darstellung der allerfeinsten Fibrillen eignet sich nach Cajal am besten die ca. 1 %-Lösung.

Drei neuerdings von Cajal veröffentlichte Methoden, welche sich an obige Fibrillenmethode anschliessen, ergeben verschiedene Resultate, insofern die erste die Axenzylinder der markhaltigen Fasern, die zweite die marklosen Neuriten, die dritte besonders die Endverästelungen der Axenzylinder färbt. Wenn diese drei Methoden auch in Bezug auf die Darstellung der Neurofibrillen der speziellen Fibrillenmethode Cajals bei weitem nachstehen, so sind sie doch vielleicht für Untersuchungen an pathologischem Material um so brauchbarer.

I. Färbung der myelinhaltigen Axenzylinder.

1. Kleine Objekte (bis 1/2 cm gross) 24 Stunden in 96prozentigem Alkohol gehärtet.
2. Die halbierten Stückchen in Aq. dest. und in 1,5 prozentige Argent. nitr.-Lösung für 4 Tage (im Brutofen bei 30—35° C.) gebracht.
3. Abwaschen in Aq. dest.; Reduktion des imprägnierenden Silbers in einer Lösung von:

Acid. pyrogallic. (oder Hydrochinon)	1—2 gr.	24 Stunden.
Aq. dest.	100,0 „	
Formalin (rein)	5,0 „	
Schwefligsaures Natron .	0,25—0,5 „	

Für Gehirn und Kleinhirn ist es vorteilhaft, 1 gr. schwefligs. Natron zu nehmen, da die Differenzierung dann besser wird. Durch Hydrochinon tritt kräftigere Färbung als durch Pyrogallol ein.
4. Abspülen in Aq. dest, Entwässern, Zelloidineinbettung, Schneiden.
5. Vergolden und Fixieren im Tonfixierbade (falls die mittleren Teile der Schnitte zu hellrot): Rhodanammonium.

Fixiernatron . . aa 3,0.
Aq. dest. . . . 100,0,

dazu im Momente des Gebrauchs einige Tropfen 1prozentiger Goldchloridlösung.
6. Entwässern, Aufhellen (Karbolxylol, kein Nelken- oder Bergamottöl), Kanadabalsam.

Die markhaltigen Axenzylinder sind braunrot gefärbt, auch die Neurofibrillen der grösseren Nervenzellen, sowie gröbere perizelluläre Fasergeflechte.

II. Färbung der myelinfreien Axenzylinder und der Neurofibrillen.

1. Härtung dünnster Stückchen (bis 3,5 mm) in:

   Alkohol (96 %) . 100,0, } 24 Stunden.
   Ammoniak . 0,25—1,0, }

2. Auswaschen in Aq. dest. (mehrfach innerhalb einiger Minuten zu wechseln).
3. Übertragen in 1,5 prozentige Argent. nitr.-Lösung (3—5 Tage im Brutschrank bei 30—35 ° C.).
4. Reduktion des Silbernitrats in:

   Acid. pyrogall. . 2,0, }
   Formalin . . . 5,0, } 24 Stunden.
   Aq. dest. . . 100,0, }

5. Entwässern, Einbetten, Schneiden.
6. Vergolden der zu hellen Schnitte wie bei Nr. I.

Alle marklosen Fasern sind rot gefärbt, ebenso die feinsten markhaltigen; auch die Neurofibrillen der grossen Zellen färben sich und zwar die primären etwas blau; die sekundären sind ausserordentlich fein.

III. Färbung der Endgeflechte der nervösen Fasern.

1. Fixierung der Stückchen in

   Formalin . . . 25,0, }
   Aq. dest. . . 100,0, } 24—48 Stunden.
   Ammoniak 0,25—1,0, }

2. Auswaschen in fliessendem Wasser (einige Stunden).
3. Imprägnieren mit 1—3 prozentiger Argent. nitr.-Lösung 3 Tage bei 30—35 ° C.
4. Auswaschen in Aq. dest. (einige Sekunden).
5. Reduktion wie bei Nr. II, Entwässern, Einbetten etc.

Die perizellulären Plexus und die Endkolben der Fibrillen sind grau oder schwarz gefärbt. Die myelinhaltigen Fasern sind ungefärbt, Nervenzellen gelb, Fibrillen schlecht dargestellt.

Nach dem Vorbild Bielschowskys empfiehlt Bakay (Lenhosséks Assistent) auch für die erste Methode ein Vertonen der Schnitte im Goldbade in folgender Weise: Die Schnitte kommen in Aq. dest., dann in eine schwache Goldlösung (4 ccm 1prozentige Goldchloridlösung + 150 ccm Aq. dest.) für 10—60 Minuten, wodurch die gelben Schnitte stahlgrau werden. Zuletzt Fixieren in 3—5prozentigem Fixiernatron (5 Minuten) und Auswaschen in fliessendem Wasser (10 Minuten). Alkohol, Öl, Balsam.

Was die Bedeutung der Cajalschen Fibrillenmethode betrifft, so hebt v. Lenhossék dreierlei hervor:

1. dass sie sich für Wirbeltiere wie Wirbellose, und zwar sowohl für das embryonale wie für das ausgebildete Nervensystem eigne,
2. dass sie einfach und leicht zu handhaben sei,
3. dass sie annähernd beständige Ergebnisse liefere.

Für das Rückenmark junger Kaninchen und die Grosshirnrinde erwachsener Kaninchen sei sie sogar absolut sicher. Andererseits aber bietet sie bisher noch einen grossen Mangel: die Durchfärbung des ganzen Stückes ist nicht gleichmässig, es wird stets nur eine bestimmte mittlere Zone gut dargestellt. In Hinsicht auf pathologische Forschung ist sie also schon deshalb der Bielschowskyschen Methode unterlegen. Ferner treten nach Bielschowskys Ansicht bei Cajals Verfahren Schrumpfungsvorgänge darin zutage, dass die tingierten Elemente dicht aufeinander rücken und ursprünglich getrennte Gebilde miteinander verkleben.

Beide Verfahren sind nach meinen Erfahrungen mit Vorteil auch an der Retina zu verwenden.

Literatur.

Apáthy, Erfahrungen in der Behandlung des Nervensystems für histologische Zwecke. I. Methylenblau. Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. B. IX. 1892.

— Das leitende Element des Nervensystems und seine topographischen Beziehungen zu den Zellen. Mitteil. d. Zool. Station zu Neapel. B. XII. p. 495—748. 1897.

— Über Neurofibrillen. Proceed. of the internat. congress of zoology. Cambridge 1898.

Auerbach, Das terminale Endnetz in seinen Beziehungen zu den Ganglienzellen der Zentralorgane. Monatsschr. f. Psych. u. Neurol. 1899.

Bartels, Darstellung der Axenzylinder in den Herden der multiplen Sclerose nach neueren Methoden. Neurol. Zentrbl. p. 702. 1903, sowie D. Zeitschr. f. Nervenhk. Nr. 24. 1903.

— Die fibrilläre Struktur der Ganglienzellenschicht der Netzhaut. Zeitschr. f. Augenhk. Nr. 4. 1904.

Becker, Eine neue Axenzylinderfärbung. LXXIII. Naturf.-Vers. zu Hamburg. Sept. 1901.

Bethe, Artikel „Nervenfasern und -zellen“ in Encyklop. der mikrosk. Technik, p. 928 ff. 1903.

— Allgem. Anat. u. Physiol. des Nervensystems. Leipzig, Thieme. 1903.

— Über die Neurofibrillen in den Ganglienzellen von Wirbeltieren und ihre Beziehungen zu den Golginetzen. Arch. f. mikrosk. Anat. B. LV. 1900.

— Das Molybdänverfahren zur Darstellung der Neurofibrillen und Golginetze im Zentralnervensystem. Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk. p. 13. 1900.
— Über die Primitivfibrillen in den Ganglienzellen von Menschen und anderen Wirbeltieren. Morphol. Arb. B. VIII. p. 95 ff. 1897.
Bielschowsky, Die Silberimprägnation der Axenzylinder. Neurol. Zentralbl. Nr. 13. p. 579. 1902.
— Die Silberimprägnation der Neurofibrillen. Neurol. Zentralbl. Nr. 21. p. 997. 1903.
— Die marklosen Nervenfasern in den Herden der multiplen Sclerose. Neurol. Zentralbl. p. 59. 1904.
— Die Silberimprägnation der Neurofibrillen. Journ. f. Psychol. u. Neurologie. Bd. III. 1904.
— u. Pollack, Zur Kenntnis der Innervation des Säugetierauges. Neurol. Zentralbl. p. 387. 1904.
Cajal, R. y, Un sencillo método de coloración selectiva del retículo protoplásmico y sus efectos en los diversos organos nerviosos. Trabajos del laborator de invest. biol. de la Universitad de Madrid. II. p. 129. 1903.
— Algunos métodos de coloración de los cilindros-ejes, neurofibrillas y nidos nerviosos. ibid. III. p. 1. 1904.
— Méthode nouvelle pour la coloration des Neurofibrilles. Compt.-Rend. de la soc. de Biol. p. 1565. 1903.
— Trois modifications pour les usages différents de la méthode de coloration des neurofibrilles par l'argent réduit. Comptes-Rend. de la soc. de Biol. p. 368. 1904.
— Consideraciones criticas sobra la teoria de A. Bethe acerca la estructura y conexiones de las celulas nerviosos. Trab. del labor etc. etc. p. 101. 1903.
Chilesotti, Eine Karminfärbung der Axenzylinder, welche bei jeder Behandlungsmethode gelingt. (Urankarminfärbung nach Schmaus modifiziert.) Zentralbl. f. allg. Path. p. 193. 1902.
— Une coloration élective des cylindres d'axe. Zeitschr. f. wiss. Mikr. XIX. p. 161. 1903.
Donaggio, Il reticolo fibrillare endocellulare e il cilindrasse della cellula nervosa dei vertebrati e metodi vari di colorazione elettiva del reticolo endocellulare e del reticolo periferico basati sull'azione della piridina sull tessuto nervoso. — Riv. speriment. di Freniatria. V. XXX. F. II. 1904.
— Contributo alla conoscenza dell'intima struttura della cellula nervosa dei Vertebrati. Riv. speriment. di Freniatria. V. XXIV. 1898.
— Nuove osservazioni sulla struttura della cellula nervosa. Ibid. Vol. XXIV 1899.
Ellermann, Eine neue Axenzylinderfärbung. Bibliothek for Laeger p. 39. 1904. (Dänisch.) Ref. Ziegler-Schmidt. Zentralbl. f. allg. Path. p. 456. 1904.
Engelmann, Über die Diskontinuität des Axenzylinders und den fibrillären Bau der Nervenfasern. Pflügers Arch. B. XXII. 1880.

Fajersztajn, Über den Hämatoxylinchromlack zur Färbung des Axenzylinders, Polnisches Arch. f. biolog. und mediz. Wiss. Bd. I. p. 188.
— Ein neues Silberimprägnationsverfahren zur Färbung der Axenzylinder. (Vorl. Mitteil.) Neurol. Zentbl. XIX. p. 98. 1901.

van Gehuchten, Considérations sur la structure de la cellule nerveuse et sur les connexions anatomiques des Neurones. Le Nevraxe. — Fasc. I. 1904.

van Gieson, Labaratory notes of technical methods for the nervous system. N.—Y. Med. Journ. July 20. 1889.

Harris, Two new methods of staining the axiscylinders of nerves in the fresh state. Some microchemic reactions of Toluidinblue. The Philad. Med. Journ. I. 1898.

Held, Beiträge zur Struktur der Nervenzellen und ihrer Fortsätze. (I, II.) Arch. f. Anat. 1895. p. 396 ff.
u. „ „ „ 1897. p. 65 ff.

Kaplan, Färbungen des Nervensystems. Allg. Zeitschr. f. Psych. Bd. 58. 1901.
— Axenzylinderfärbung. Neurol. Zentralbl. XX. p. 343. 1901.
— Nervenfärbungen. Arch. f. Psych. B. 35. 1902.

Kotzowski, Zur Methodik der Färbung der Nervenfasern des Zentralnervensystems. Obozrenje psichjatrij. p. 481. 1903. (Russisch.)

v. Lenhossék, Ramón y Cajals neue Fibrillenmethode. Neurolog. Zentralbl. Nr. 13. 1904.

Marie, P. et Guillain, Méthode de mensuration des atrophies du névraxe. Compt.-Rend. Soc. de Biol. IV. p. 38.

Meyer, Semi, Eine Eisenimprägnation der Neurofibrillen. Anat. Anz. XX. p. 535.

Minor, Die traumatischen Erkrankungen des Rückenmarkes. Handbuch der pathol. Anat. des Nervensystems. Berlin, Karger, p. 1008, 1903.

Möller, Bemerkungen zur van Giesonschen Färbungsmethode. Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. XV, 1898.

Mönckeberg und Bethe, Die Degeneration der markhaltigen Nervenfasern der Wirbeltiere unter hauptsächlicher Berücksichtigung des Verhaltens der Primitivfibrillen. Arch. f. mikr. Anat. LIV, 1899.

Platner, Eine neue Methode zur Darstellung des Neurokeratingerüstes der Nervenfasern, Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. VI. p. 186. 1889.

Schmaus, Technische Notizen zur Färbung der Axenzylinder. Münch. med. Wochenschr.. 1891.

Strähuber, Eine elektive Färbung der Axenzylinder, resp. isolierte Tinktion eines seiner Bestandteile. Zentralbl. f. allgem. Path., XII, 1901.

Ströbe, Zur Technik der Axenzylinderfärbung im zentralen und peripheren Nervensystem. Zentralbl. f. allgem. Path., IV, 1893.

Tartuferi, Über eine neue Metallimprägnationsmethode. Bericht über die XXXI. Vers. d. ophth. Ges. Heidelberg (1903), Wiesbaden 1904.

Warncke, Zur Darstellung der Axenzylinderfibrillen in den markhaltigen Nervenfasern des Zentralnervensystems. Arch. f. Psych. u. Nervenkrankh., B. XXXVIII, H. I, 1904.

Weiss, A propos de la note de M. S.-R. y Cajal „Méthode nouvelle pour la coloration des Neurofibrilles." Compt.-Rend. Soc. de Biol. LV, 1903.
Wolters, Drei neue Methoden zur Mark- und Axenzylinderfärbung mittels Hämatoxylinfärbung. Zeitschr. f. wiss. Mikrosk., B. VII, 1890.

D. Die Färbung der Neuroglia.

Die Neurogliafärbung Weigerts.[1]

1. Fixierung und Beizung in essigsaurer Kupferoxydfluorchromlösung mit Zusatz von Formol (10prozentig) 8 Tage.
2. Vorbereitung der Stücke zum Schneiden. (Zelloidinmethode.) 3 Tage.
3. Anfertigung der Schnitte.
4. Reduktion durch Kalium hypermanganicum und durch Chromogenlösung mit Ameisensäure + schwefliger Säure.
5. Verstärkung der Färbbarkeit für die Neuroglia und Kontrastfärbung der nervösen Elemente durch einfach-wässerige (5prozentige) Chromogenlösung.
6. Modifizierte Fibrinmethode.

Gesamtdauer: 12 Tage. (3—6 dauern zusammen 1 Tag.)

Diese im November 1895 von Carl Weigert nach siebenjähriger Arbeit publizierte Methode stellt einen solchen Markstein dar, dass sie ausführlich erörtert werden muss.

Die für die Neurogliafärbung nötigen prinzipiellen Massnahmen zerfallen in 3—4 Teile:

1a. Fixierung der dem Zentralnervensysteme entnommenen Stücke.

1b. Beizung mit höher oxydierten Metallverbindungen; beide Akte sind eventuell in einem zu vereinigen.

2. Reduktion der Metallverbindung.

3. Färbung.

1. Fixierung und Beizung.

a) Diese beiden Prozeduren kann man getrennt oder vereint vornehmen; ersteres, wenn man eventuell die Präparate auch noch nach anderen Methoden behandeln will, z. B. nach Marchi, Golgi, Nissl oder der Markscheidenmethode. In diesem Falle fixiert man die Stücke mit 10prozentigem Formol; schwächere Lösungen fixieren nicht

---

[1]) C. Weigert: Beiträge zur Kenntnis der normalen menschlichen Neuroglia. Frankfurt a. M., b. Diesterweg 1895.

stark genug, das ganz frische Material muss in möglichst kleine und nicht über einen halben Zentimeter dicke Stücke geschnitten in die Fixierungsflüssigkeit kommen; grössere Stücke ergeben keine sichere Färbung mehr. Ganz besonders gut gelingt die Färbung an Gehirnen von Diabetikern, ganz besonders schlecht an sehr feuchten Gehirnen (z. B. Meningitis tuberculosa). Als ungefähre Regel gibt Weigert an, dass ein Rückenmark, das beim frischen Durchschneiden über die Schnittfläche hervorquillt, für die Neurogliafärbung besonders ungeeignet ist; ebenso ist ein Gehirn meist unbrauchbar, wenn die mittlere Kommissur maceriert ist.

Zur Härtung nehme man flache Schalen, auf deren Boden Fliesspapier kommt, damit das Verkrümmen der dünnen Stücke vermieden wird; die Formollösung wird nur am 2. Tage erneuert; die Härtung ist nach 4 Tagen meist schon genügend; die Stücke halten sich aber auch Jahre lang im Formol noch färbungsfähig.

Interessiert uns aber weiter keine andere Färbung als die der Neuroglia, so ist es besser, die frischen Stückchen mit Umgehung des einfachen Formols direkt in die gleich zu beschreibende Kupferfluorchromlösung zu bringen, der man dann aber 10 % Formol zusetzen muss. (Wechseln der Lösung am 2. Tag.)

b) Die Beizung kann an den frischen wie an den formolgehärteten Stücken erfolgen; auch mit Chromaten gebeizte Stücke gestatten eine Neurogliafärbung, wenn nur statt der üblichen Müllerschen Lösung eine gesättigte (ca. 5prozentige) Lösung von Kalium brichromicum verwandt wurde; doch ist man auch hier nie ganz sicher vor einer Mitfärbung der Axenzylinder.

Als typische Neurogliabeize hat nun Weigert folgende Lösung angegeben:

5 prozentiges essigsaures Kupferoxyd,
5 prozentige gewöhnliche Essigsäure,
2,5 prozentige Fluorchromlösung (also 50,0 + 50,0 + 25,0 ad 1000,0 Aq. dest.)

Man kocht das Fluorchrom erst in Wasser, dreht während des vollen Kochens die Flamme aus, fügt zuerst die Essigsäure, dann das feingepulverte essigsaure Kupferoxyd hinzu, rührt mit einem Glasstab tüchtig um und lässt erkalten.

Diese Lösung ist auch für die Markscheidenfärbung zu verwenden, da sie an den chromierten Stücken keine Niederschläge macht und andererseits gegenüber der Seignettesalzlösung den Vorteil bietet, dass eine weitere Kupferung mit einfach wässriger Lösung des Kupfersalzes überflüssig ist.

In dieser Lösung (mit 10 % Formolzusatz) bleiben die Stückchen 8 oder mehr Tage bei Zimmertemperatur; dann werden sie abgespült, entwässert und in Zelloidin eingebettet.

2. Reduktion; diese erfolgt für die chromierten Präparate anders als für die gekupferten; im ersteren Falle ist die Neurogliafärbung vorläufig noch nicht genügend. Für die gekupferten Schnitte empfiehlt sich als energische Reduktion die nach Lustgarten (mit Kalium hypermanganicum und schwefliger Säure), welche von Weigert etwas modifiziert ist durch Chromogen [1]) zur Erzielung der Kontrastfarbe. Die Verwendung des Lustgartenschen Verfahrens durch Weigert ist insofern ein Novum, als dasselbe bisher nie zur Verstärkung einer späteren Färbung, sondern stets nur zur Entfärbung resp. Differenzierung nach eingetretener Überfärbung benutzt wurde.

Da die wässrige Chromogenlösung nicht kräftig genug wirkt, so löst man 5 % Chromogen und 5 % Ameisensäure in Wasser; filtriert und setzt vor dem Gebrauch zu 90 ccm dieser Flüssigkeit, 10 ccm einer 10prozentigen Lösung von einfach schwefligsaurem Natron (dem in der Photographie gebräuchlichen Natriumsulfit) hinzu.

Man bringt die Schnitte nun zunächst auf etwa 10 Minuten in eine ca. 1/3 prozentige Lösung von Kalium hypermanganicum, wäscht sie nach vorsichtigem Abgiessen dieser Lösung mit Wasser aus, giesst letzteres ebenfalls ab und tut dann die Reduktionsflüssigkeit hinzu. Die vorher gebräunten Schnitte sind bald entfärbt, bleiben aber am besten ca. 2—4 Stunden in der Lösung.

Färbt man jetzt bereits die Schnitte, so sind die Neurogliafasern blau, das Bindegewebe farblos. Kommt es aber auf diese Farblosigkeit nicht an, so empfiehlt sich die folgende Prozedur, bei der zwar das collagene Gewebe blau mit einem Stich ins Violette wird, aber andererseits die Neurogliafasern viel dunkler werden, die feinsten deutlich hervortreten, und die Nervenzellen, Ependymzellen und gröberen Axenzylinder einen gelblichen Ton annehmen. Wegen dieser mannigfachen Vorteile nehme man also stets die Kontrastfärbung in der jetzt folgenden Weise vor:

Kontrastfärbung. Die Schnitte kommen über Nacht (je länger, desto besser) nach zweimaligem Abspülen in Wasser in eine einfache, gesättigte, wässerige 5prozentige Chromogenlösung, welche man vorher sorgfältig filtriert. Sind die Schnitte darnach zweimal abgespült, so schliesst sich die Färbung direkt an; die Schnitte verlieren sowohl

---

[1]) Chromogen ist eine Naphtalinverbindung, nämlich das saure Natronsalz der 3—6 Disulfosäure des 1—8 Dioxynaphtalins. Die Lösung reagiert sauer und wirkt reduzierend.

in Wasser wie in Alkohol leicht ihre Färbbarkeit, können aber in Oxalsäure — Alkohol (90 ccm 80 prozentiger Alkohol + 10 ccm 5 prozentiger Oxalsäurelösung) tagelang aufgehoben werden; vielleicht ist die Färbung sogar darnach noch haltbarer. Neuerdings wendet Weigert Pikrinsäure-Alkohol an und zwar in folgender Zusammensetzung: Gesättigte Pikrinsäurelösung 10 ccm, 1 prozentiges karminsaures Natron 2 ccm, Alkohol (96 %) 90 ccm.

3. Die eigentliche Färbung. (Modifizierte Fibrinmethode.) Statt der wässrigen Methylviolettlösung benutzt man eine heissgesättigte (nach dem Erkalten vom Bodensatz abgegossene) alkoholische Lösung (70—80 prozentiger Alkohol) ohne Anilinölzusatz, aber eventuell mit Zusatz von 5 % einer 5 prozentigen Oxalsäurelösung zwecks besserer Haltbarkeit. Die Jodjodkaliumlösung ist die ursprünglich angegebene gesättigte Lösung von Jod in 5 prozentiger Jodkaliumlösung. Anilinxylol wird in gleichem Verhältnis (nicht wie sonst 2 : 1) angewendet.

Gefärbt werden die Schnitte auf dem Objektträger; damit sie keine Falten bilden, nehme man sie aus einer grossen Schale mit Wasser mit dem vorher mit Alkohol abgeriebenen Objektträger auf; die Methylviolettlösung wird nun auf den abgetrockneten Schnitt aufgeträufelt, die Färbung erfolgt fast momentan. Auch die Jodjodkaliumlösung wird auf den (gefärbten und abgetrockneten) Schnitt aufgeträufelt und sofort abgegossen.

Die Auswaschung mit Anilinölxylol muss sehr gründlich geschehen; vor dem Einlegen in Balsam wasche man noch mit reinem Xylol sehr sorgfältig aus, da sich sonst das Präparat nicht hält; die Neuroglia ist hierin viel empfindlicher als das Fibrin; auch halten sich merkwürdigerweise die Präparate besser, wenn sie einige Tage dem Tageslicht ausgesetzt bleiben (im Gegensatz zur Golgi-Cajal-Methode). Statt des Kanadabalsams empfiehlt Weigert Kolophonium-Terpentinlack, der sich ihm am besten bewährte.

Wenn auch diese hervorragende Methode eine absolut mathematische Sicherheit noch nicht bietet, wenigstens nicht in dieser Form, so liegt dennoch ein ungemeiner Vorteil und eine hohe Bedeutung dieser elektiven Neurogliafärbung darin, dass sie für die Pathologie gesucht und gefunden wurde und dass Weigert zugleich auch erst mit ihr die Frage nach dem Bau und dem Wesen der so strittigen Neuroglia gelöst hat, derart, dass sich die Fasern als differenziert vom Protoplasma darstellen, dass die Neuroglia eine nicht nervöse Substanz ist.

Dass Weigert seine Neurogliamethode auch zur isolierten Färbung der Gallengangskapillaren und der anisotropen Substanz der Muskelfasern etc. ver-

wendet, sei hierbei noch erwähnt. Eine annehmbare chemische Erklärung der Methode zu geben, ist bisher nicht möglich, obwohl zweifellos die Sicherheit der Methode gewinnen würde, wenn man den Sinn jeder der verschiedenen Prozeduren auch verstände. Die Methodik: Beizung mit Metallsalzen und Färbung mit einem basischen Farbstoff (Methylviolett) ist von Weigert neu eingeführt, aber noch nicht recht zu erklären; denn mit Metallsalzen beizte man sonst immer dann, wenn man mit einem sauren Farbstoff (besonders den eigentlichen Beizenfarbstoffen, welche durchwegs Farbsäuren sind) färben wollte In welcher Weise durch Metallbeizung die Färbung mit basischen Farbstoffen beeinflusst wird, ist noch nicht systematisch untersucht. Die Beize ist ein Gemisch von Kupfersulfat und Chromalaun resp. Fluorchrom. Chrombeizen wurden in der Histologie früher nur in Form der hochoxydierten Chromverbindungen benutzt, in denen das Chrom als Säure auftritt: Kaliumbichromat, Chromsäure. In Chromalaun (Kalium-Chromisulfat) ist das Chrom aber als basischer Bestandteil enthalten. Wie bei der „Reduktion" (Kaliumpermanganat, dann Chromogen und schweflige Säure) das Kaliumpermanganat reduzierend wirken kann, ist nicht leicht ersichtlich; andererseits sind Chromogen und schweflige Säure Reduktionsmittel. Das Wesen der eigentlichen Färbung (Weigerts lang bekannte Fibrinfärbung) ist auch noch unklar. Ebenso scheint Bendas Beizenfärbung für Neuroglia einer strengen chemischen Erklärung noch nicht zugänglich. (L. Michaëlis).

Die Färbung nach Benda.

Härtung:

1. Formalin (10% — rein!!) 2 Tage.
2. Beizung mindestens 2 Tage im Brutofen (Weigerts Beize).
3. Nachbeizung 2 Tage mit 0,5 prozentiger wässeriger Chromsäurelösung; dann Aqua 24 Stunden.
4. Entwässern in Alkohol steigender Konzentration.
5. Paraffindurchtränkung.
6. Schneiden, Aufkleben.
7. Xylol (oder Benzin) Alkohol abs., — 90% Wasser.

Färbung A.

8. Beizung (24 Stunden) in 4 prozentiger Eisenalaunlösung oder in verdünntem Liq. ferri sulf. oxyd. 1 : 2 Vol. Aq. dest.
9. Abspülen in fliessendem Wasser, 15—30 Sekunden.
10. Färben in dünner, gelber, wässeriger Lösung von sulfalizarinsaurem Natron.
11. Eintauchen in destill. Wasser, Abtupfen mit Fliesspapier.
12. Färben in 0,1 prozentiger wässeriger Lösung von Toluidinblau (Erwärmen im Uhrschälchen), dann ca. 15 Minuten in der erkaltenden Flüssigkeit.
13. Abspülen in 1 prozentiger Essigsäure.

14. Abtrocknen mit Fliesspapier, Eintauchen in Alk. absol.
15. Differenzieren in Kreosot ca. 10 Minuten (Mikroskopkontrolle).
16. Abtrocknen mit Fliesspapier, Xylol, Balsam.

Färbung B.

10. 24 Stunden in weingelber wässeriger Hämatoxylinfärbung.
11. Differenzieren in 30 prozentiger Essigsäure, bis der Schnitt blaugrau ist.
12. Abspülen mit Aq. dest. und Abtupfen.
13. Aufgiessen von Anilinwasser-Gentianaviolett (Ehrlich) oder Methylviolett-Oxalsäure (Weigert) oder Krystallviolett-Anilinwasser-Salzsäure (Benda), Erwärmen bis Dämpfe aufsteigen.
14. Abspülen und Abtupfen.
15. Überspülen von Jodjodkaliumlösung.
16. Abspülen, Abtrocknen.
17. Differenzieren mit Anilin-Xylol $\overline{aa}$.
18. Abtupfen, Xylol-Balsam.

Oder endlich Färbung C.

10. 24 Stunden in weingelber wässeriger Hämatoxylinlösung.
11. Differenzieren und Nachfärben mit Pikrinsäure, Säurefuchsin (van Gieson).
12. Alkohol, Xylol, Balsam.

Nach Bendas Angaben übertrifft seine Färbung die anderen durch ihre mathematische Sicherheit für menschliches und jedes Wirbeltiermaterial, sowie durch bessere Darstellung der übrigen histologischen Bestandteile.

Viel gebraucht wird ferner die (technisch freilich nicht neue)

Färbung nach Anglade.

1. Härtung in Fols Flüssigkeit (3 Teile) + 7 % Sublimatlösung (1 Teil). 48 Stunden bei 37°. Auswaschen in Alkohol.
2. Einschliessen der Präparate in Aceton 24 Stunden; in Paraffin 3 Stunden.
3. Färbung. Die feinen Schnitte werden in einer warmen saturierten Lösung von Grüblers Viktoriablau solange gehalten, bis Dämpfe entweichen. Bespülung mit Grams Lösung. Entfärbung in Anilinxylol (2 : 1).
4. Nochmals in absolutem Alkohol auswaschen; zu letzterem wird eine verdünnte Lösung von Erythrosin zugesetzt, welches das Bindegewebe, Nervenzellen und Axenzylinder rot färbt.
5. Einbetten in Kanadabalsam oder Bernsteinfirnis.

Die Angladesche Färbung, die auch bei Tieren anwendbar ist, zeigt die Fasern sehr dünn und blaulila gefärbt, die Kerne teils gross und hell, teils klein und dunkelblau; die Nervenzellen sind gelblichgrün gefärbt. Deitersche Zellen findet man nicht. Im übrigen erscheint die Anordnung der Elemente der Glia in der Hirnrinde analog der von Weigert dargestellten.

Die Färbung nach Beneke.

1. Härtung in Alkohol, Einbetten in Paraffin.
2. Schneiden. Schnitte auf dem Objektträger von Paraffin wie üblich befreit.
3. Färben in wässeriger Anilingentianaviolettlösung, 10–20 Minuten.
   Anilin . . . . 10,0.
   Aq. dest. . . . . 100,0.
   Filtrieren, hinzufügen von konzentr. alkohol. Gentianaviolettlösung 5—10 Tropfen.
4. Abwaschen; danach Lugolsche Lösung:
   Jod. 4,0
   Kal. jod. 6,0
   Aq. dest. . . . . . . 100,0. 1 Minute.
5. Gründlich abtrocknen mit mehrfacher Lage Fliesspapier.
6. Anilinxylol (2 : 3); die violette Farbe schwindet.
7. Xylol, sobald der Schnitt entwässert und klar ist. Balsam.

Die Gliazellen und -Fasern sind blauviolett resp. rötlich, die eigentlichen nervösen Elemente, ausser den Zellkernen, bleiben ungefärbt.

Diese Färbung basiert ebenso wie Weigerts elektive Neurogliafärbung in letzter Linie auf der Fibrinmethode Weigerts, nur ist in dieser das Verhältnis von Anilin : Xylol = 2 : 1, wobei das Anilin das entfärbende Element bildet.

Die Färbung scheint haltbare Präparate zu geben, ist aber angesichts Weigerts neuer Methode entbehrlich.

Die Färbung nach Kulschitzky.

1. Härten in Kulschitzkys Lösung[1]) (im Dunkeln).
2. Alkohol (96 %), ohne vorheriges Auswaschen; Paraffineinbettung, Schneiden.

[1]) Kulschitzkys Lösung: Gesättigte alkohol. (50 prozentige) Lösung von Kal. bichrom. und Cupr. sulfur.; vor dem Gebrauch hinzuzufügen sechs Tropfen Eisessig auf 100 ccm Lösung. — Im Dunkeln zu halten.

3. Färben in:

Patent-Säurerubin	0,25.
Gesättigte Pikrinsäurelösung .	aa 100,0.
2prozentige Eisessiglösung .	

   (wenige Sekunden).
4. Alkohol (96 %), Alcoh. absol., Xylol, Balsam. Die Schnitte müssen sehr fein sein.

Die Neuroglia erscheint rötlich-violett; Nervenelemente erscheinen bei kurzer Färbung fast gar nicht, im anderen Falle aber gelb-rötlich gefärbt.

Neuerdings verwendet Kulschitzky folgende Farblösung: Alkohol (96 %) 100 ccm. Patent-Säurerubinlösung (wie oben) 3—5 ccm; die Färbung dauert hierbei 1/2 Stunde und mehr.

Die Färbung nach Yamagiva.

1. Fixieren in Müllerscher Flüssigkeit (1 Monat).
2. Härten direkt in Alc. absol. 3—7 Tage (täglich erneuern).
3. Celloidineinbettung, Schneiden.
4. Färbung in konzentr. alkoh. Eosinlösung (12—24 Std.), dann in konzentr. wässer. Anilinblaulösung 4—6 Std.
5. Differenzierung in dem durch Einträufeln von 1 % Kalilösung schwach alkalisch gemachten verdünnten Alkohol.

   (Prinzip der Ströbeschen Axenzylinderfärbung!) Die tiefblau gefärbten Schnitte werden momentan oder allmählich rötlich-bräunlich, je nach der Alkaleszenz des Alkohols.
6. Auswaschen in Aq. dest.
7. Ausziehen des überschüssigen Anilinblau in verdünntem Alkohol. Schnitte zeigen rötlichen Farbenton.
8. Alc. absol., Origanumöl (etwas mehr Blaufärbung), Balsam.

Es zeigen sich dann die Axenzylinder tiefblau, die Gliafasern und roten Blutkörperchen dunkelrot, die Markscheiden hellrot, Protoplasma der Gliazellen blassviolett (resp. bläulich rötlich), Zelleib der Nervenzellen blassbläulich-grau (mit grünlich gefärbten Körnern), ihre dicken Fortsätze blassbläulich, Bindegewebsfasern, Adventitia Intima der Gefässe himmelblau-schwachgrünlich, Media bläulich-rötlich, Kernmembran aller Zellkerne bläulich, Kernkörperchen der Nervenzellen tiefviolett-blau, die der Gliazellen bläulich.

Also gleichzeitige Kontrastfärbung der Gliafasern (rot), Protoplasma der Gliazellen (schwachviolett), Axenzylinder (tiefblau), Bindegewebsfasern (himmelblau-grünlich).

Die Resultate beziehen sich nur auf das Thalamusgliom, nicht auf das sonstige Gehirn, Rückenmark und Augengliom, woselbst Y. die Methode noch nicht erprobte. Beim Gliom der Retina dürften wohl überhaupt die Neurogliafärbungen inopportun erscheinen.

Literatur.

Anglade, Nouvelle métbode de coloration de la névroglie. Arch. de Neurol., Vol. XI, p. 346, 1901.

Benda, Erfahrungen über Neurogliafärbungen und eine neue Färbungsmethode. Neurol. Zentralbl., Nr. 17, 1900.

— Artikel „Neurogliafärbung“ in Encyklopädie d. Mikroskopie, p. 1025, 1903.

Beneke, Neurogliafärbung. Zentralbl. f. path. Anat., Bd. IV, 1893.

Brodmann, Über den Nachweis von Astrozyten mittels der Weigertschen Gliafärbung. Jenaiscbe Zeitschr. f. Naturwissensch., XXXIII B., N.F. XXVI B., p. 180, 1899.

Fischer, Einige Bemerkungen über die Färbung pathologischer Gliaformationen. Neurol. Zentralbl., p. 981, 1902.

— 2 neue Gliafärbemethoden. Zeitscbr. f. Heilk., B. XXII, H. 11, 1901.

Held, Über den Bau der Neuroglia und über die Wand der Lymphgefässe in Haut und Schleimhaut. XXVIII B. der Abhandlungen der math. phys. Klasse der Kgl. sächs. Ges. d. Wissensch. — Nr. 4, Leipzig, Teubner, 1903. (Ref. Ziegler-Schmidt, Zentralbl. f. allg. Path. XV. 1904.)

Ljubuschin, Die Methode Anglades in ihrer Anwendung beim Studium der Elemente der Neuroglia. Neurol. Zentralbl., p. 732, 1902.

Mallory, Über gewisse eigentümliche Färbereaktionen der Neuroglia. Zentralbl. f. allg. Path., Nr. 19, 1895, sowie Anat. Anz. B. VI.

— A Contribution to staining methods: Phosphotungstic acid hämatoxylin for neuroglia fibres. Journ. of exper. med. Balt., V. 5, 1900.

Müller, E., Studien über Neuroglia. Arch. f. mikrosk. Anat., LV, 1899.

Pollack, Neuroglia und Neurogliafärbung. Arch. f. mikrosk. Anat., 1896.

Pusy, Sections of a Glioma of the retina stained by Mallorys Neuroglia Stain. Transact. of the Chicago Pathol. Soc. Nov. 1901.

Wart, On a rapid method of staining Neuroglia. Bull. of the John Hopkins Hospital, V. XIV, 1903.

Weigert, Beiträge zur Kenntnis der normalen menschlichen Neuroglia. Frankfurt a. M., 1895.

— Artikel „Neurogliafärbung“ in Encyklopädie d. Mikroskopie, p. 1014, 1903.

— Bemerkungen über eine Kleinhirnveränderung bei Tabes dorsalis. Neurol. Zentralbl., 16. Aug. 1904. (10 Tage nach Weigerts Tod erschienen!)

Yamagiva, Eine neue Färbung der Neuroglia. Virch. Arch., B. CLX, 1900.

— Gliafärbung. Präparate von einer Gliomatose der Varolschen Brücke. Vereinsb. Nr. 23. Deutsche med. Wochenschr. 1903.

Die Färbung des peripherischen Nervensystems.

Für das periphere Nervensystem kommen die gleichen Methoden und die gleiche Behandlung wie für das zentrale Nervensystem — mutatis mutandis — in Betracht.

In höherem Masse als beim Zentralnervensystem kann hier das Zupfverfahren angewendet werden, wobei man nur darauf achte, dass allein kurze Abschnitte von Nerven behandelt werden, da längere sich schwer trennen lassen.

Als hauptsächlich in Betracht kommende Färbemethoden seien hier jedoch neben der Golgischen Chromsilbermethode und dem Ehrlichschen Verfahren mittels subkutaner Methylenblauinjektion die Weigertsche und Marchische Färbung, sowie Azoulays Modifikation angeführt, ferner die Färbung mit Karmin, Hämatoxylin und Nigrosin. und das Platnersche Verfahren.

Um Nervenendigungen an Muskelfasern und Gefässen darzustellen, empfahl Gad die

Methode von Chr. Sihler.[1])

Der Prozess besteht aus 3 Teilen

1. Mazerieren.
2. Färben der aufgelockerten Muskelbündel mit Hämatoxylin.
3. Wegen Überfärbung Nachbehandlung mit Essigsäure.

Mazerationsflüssigkeit

Gewöhnliche Essigsäure	1	Massteile.
Glyzerin	1	
1 prozentige wässrige Chloralhydratlösung	6	

Färbeflüssigkeit

Hämatoxylin (Ehrlich)	1	Massteile.
Glyzerin	1	
1 prozentige wässrige Chloralhydratlösung	6	

Die Stückchen verweilen 18 Stunden in der Mazerationsflüssigkeit, kommen dann auf 1—2 Stunden in Glyzerin, die Muskelbündel werden gespalten und kommen auf 3—10 Tage in die Färbeflüssigkeit; danach werden sie in mehrfach zu wechselndes Glyzerin übertragen, zerzupft und mit Essigsäure nachbehandelt. Je länger die Präparate in Glyzerin bleiben, desto besser gelingt die Färbung.

---

[1]) Gad-Sihler, Arch. f. Anat. u. Phys. (phys. Abt.) 1895.

Wenn die Muskelbündel aus der Färbeflüssigkeit genommen werden, so ist alles gleichmässig blau, nur die Kerne schwarzblau gefärbt. Durch die Essigsäure gibt die Hauptmasse des Muskelgewebes die Farbe ab, das Fasergerüst bleibt gefärbt wie die Nervenfasern.

Die Muskelfasern sind demnach mattblau mit Quer- und Längsstreifen von dunklerem Blau; ebenso sind die myelinfreien Nerven gefärbt; die myelinhaltigen erscheinen dunkel und alle Kerne schwarzblau.

Die Methode scheint leicht und sicher und leistet fast alles, was die schwierigeren Goldmethoden bieten.

Die Goldfärbung Ranviers.

Frische Gewebsstücke werden zerzupft und in frisch ausgepressten filtrierten Zitronensaft auf 5—10 Minuten gebracht; nachdem sie durchscheinend geworden, werden sie ausgewaschen und auf 10 Minuten bis 1 Stunde in eine 1prozentige wässerige Goldchloridlösung übertragen; dann erfolgt nochmaliges Auswässern und Einbringen in dünne Essigsäurelösung (2 Tropfen auf 50,0 Aq. dest.), in welcher in 24 bis 48 Stunden durch Lichteinwirkung das Gold reduziert wird.

Die rotviolett gefärbten Stücke härtet man in Alkohol und schneidet sie oder zerzupft sie weiter.

Eine weitere Goldfärbung ist fernerhin von Frey angegeben worden. Derselbe ging ursprünglich aus von der Methode, welche Muschenkoff[1]) zur Darstellung der Nervenendigungen im quergestreiften Muskel empfohlen hatte, wobei vor dem Ansäuern und Vergolden die Anwendung einer 2prozentigen Lösung von doppeltchromsaurem Ammoniak eine Rolle spielte. Diesen Vorgang fand v. Frey jedoch für die menschliche Haut nicht brauchbar.

Die Goldfärbung nach von Frey[2])

zur Darstellung der markhaltigen Nerven und ihrer zugehörigen Endapparate.

Kleine Stückchen werden in einer 2prozentigen wässerigen Lösung von doppeltchromsaurem Ammoniak längere Zeit gehärtet, dann etwa 10 Minuten in fliessendem Wasser ausgewaschen und in ein Goldbad übertragen, welches 1 % Goldchlorid und 1 % Salzsäure enthält. Nach einer Stunde werden die Stücke oberflächlich abgespült, kommen dann in $^1/_{50}$ prozentige Chromsäure, in welcher bei Ausschluss von Licht die Reduktion langsam vor sich geht. Nach 24 Stunden erfolgt die Be-

---

[1]) Muschenkoff, Zeitschr. für wissensch. Mikroskopie, V. St. 52.

[2]) v. Frey, Arch. f. Anat. u. Phys. Supplem.-Band. (Anat. Abt.) 1897.

handlung mit Natriumhyposulfit (des Photographen), um das noch nicht reduzierte Gold zu entfernen.

Diese Fixierung wird am besten an den Schnitten vorgenommen, wozu letztere freilich ohne Einbettung direkt auf dem Gefriermikrotom geschnitten werden müssen.

Auswaschen und Benutzung des Brutofens sind zu vermeiden Frey härtet die Stücke im Eisschrank mindestens 2 Wochen vor. — Am deutlichsten zeigen dicke Schnitte den Verlauf und die Verteilung der markhaltigen Nerven.

Hervorzuheben ist, dass es sich hier nicht um eine Strukturfärbung, wie sonst bei der Vergoldung, handelt, sondern um eine Niederschlagsfärbung, indem gewisse Räume wie der Markscheidenraum mit den Goldkörnchen erfüllt werden.

Wenn das überschüssige Gold nicht durch Ausfixierung entfernt wird, so tritt unter dem Einfluss des Lichts (besonders schnell im Balsam) eine braunrote bis violette Färbung auch der übrigen Bestandteile der Haut auf, und dies ist dann eine Strukturfärbung.

Zur Darstellung der markhaltigen Hautnerven an gehärteten Präparaten ist ferner empfehlenswert

die Methode nach Heller.[1])

1. Härten in Müllerscher Flüssigkeit (1 Tag bis mehrere Mon.)
2. Schneiden auf dem Gefriermikrotom (nicht zu dünne Schnitte).
3. Auswaschen, übertragen in 1 prozentige Osmiumsäure (1 bis 2 Tage, bei 37 °).
4. Reduktion in: Natr. sulfur. 125,0
   Natr. carbon. 70,0
   Aq. dest. 500,0
   Acid. pyrogall. 15,0

   hier werden die Schnitte dunkel resp. schwarz.
5. Differenzieren mit Kal. permanganatum (die Lösung soll hell violett sein).
6. Übertragen in 1—2 prozentige Oxalsäurelösung.
7. Konservieren in Glyzerin; soll Kanadabalsam verwendet werden, so ist vorher langsame Entwässerung und Aufhellen in Nelkenöl nötig.

Die Nerven erscheinen tiefschwarz, das übrige Gewebe grüngelb; auch das Fett ist schwarz tingiert.

---

[1]) Heller, Berl. klin. Wochenschr. Nr. 50, 1895.

Die Frische des Materials spielt bei dieser Methode keine Rolle, eine Einbettung in Zelloidin erscheint untunlich, da Äther und Alkohol das Myelin wohl lösen und somit die Osmiumreaktion (im Gegensatz zum Zentralnervensystem) vereiteln; dagegen gelingt die Methode auch gut am Zentralnervensystem an Schnitten, die bereits für Weigerts Färbung vorbereitet sind; bei dieser Osmierung des Zentralnervensystems ist aber eine gründliche Auswässerung zwischen den verschiedenen Manipulationen nötig, da sonst noch nachträglich Reduktions- und Oxidationsprozesse vor sich gehen.

Nach Obersteiner eignet sich zur Darstellung degenerativer Veränderungen der Axenzylinder des peripherischen Nervensystems besonders gut das Platnersche Eisenchlorid-Dinitroresorzinverfahren.

Die Methode nach Platner.[1])

1. Härtung der Nerven 1—5 Tage in einer Lösung von
   Liq. ferri sesquichlor. 1,0.
   Aq. dest. . . . . 4,0.
2. Auswaschen in Wasser, bis dasselbe keine Reaktion mit Rhodankalium mehr gibt.
3. Übertragen in eine Lösung von Dinitroresorzin in 75 prozentigen Alkohol im Überschuss, je nach der Grösse der Objekte 2—30 Tage.
4. Entwässern, Einbetten, Schneiden.

Der Axenzylinder nimmt durch die Verbindung des Eisens mit dem Dinitroresorzin eine smaragdgrüne Farbe an, so dass Veränderungen an ihm deutlich hervortreten. — Man kann auch zur Härtung Flemmings oder Müllers Flüssigkeit verwenden. —

Zur Darstellung motorischer Nervenendigung wird viel gebraucht die **Methode nach Löwitt.**[2])

1. Frische Muskelstückchen von ca. 2 mm Durchmesser kommen auf ca. 10 Min. in eine Schale mit dem Saft einer ausgepressten Zitrone.
2. Die aufgequollenen Stückchen werden mehrfach in Aq. dest. abgespült.

---

[1]) Platner, Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. VI. p. 186. 1889.

[2]) Löwitt, Die Nerven der glatten Muskulatur. Wien. Sitz.-Ber. Bd. 71. 1875.

3. Übertragen auf 1 Stunde (mittels Glasnadeln) in 1prozentige Goldchloridlösung (im Dunkeln!).
4. Abspülen, Übertragen in eine Lösung von Acid. formic. und Aq. dest. im Verhältnis 1 : 3 (24 Stunden im Lichte!).
5. Zerzupfen der Länge nach in Glyzerin (mittels Glasnadeln) oder Einbetten und Schneiden.

Die Muskelfasern erscheinen scharlachrot bis dunkelviolett, Nerven und Nervenendigungen schwarz; die Querstreifung der Muskelfasern tritt deutlich hervor.

Benda empfiehlt für die peripheren Nerven als einfachste Markscheidenfärbung Überfärbung der Formalin-Gefrierschnitte mit Böhmers Alaunhämatoxylin und Differenzierung mit Weigerts Boraxferridcyankalilösung.

Eine Methode, deren **Mönckeberg** und **Bethe** [1]) zur Darstellung der markhaltigen Fasern der peripheren Nerven sich bedienen, ist nach ihren Angaben sicher und färbt alle Primitivfibrillen des Axenzylinders, sowie alle Stadien des pathologischen Zerfalls. Beim zentralen Nervensystem gibt sie keine guten Resultate. Ein anderer Übelstand ist die Paraffineinbettung und beschränkte Haltbarkeit (3—5 Monate).

Technik: Fixieren der in natürlicher Länge aufgespannten Nerven in 0,25 % Überosmiumsäure (24 Stunden). (Nerven von mehr als 1 mm Dicke werden am besten gespalten.) Auswaschen (4—6 Stunden) Alkohol 90 % (10 und mehr Stunden). Auswaschen (4 Stunden), dann für 6—12 Stunden in eine 2prozentige Lösung von Natriumbisulfit, welcher auf je 10 ccm direkt vor dem Einlegen 2—4 Tr. konzentrierte Salzsäure zugesetzt sind. — Wasser (1—2 Stunden). Alkohol — Xylol — Paraffin. — Schneiden (2—3 μ dick), Aufkleben mit Eiweiss und Wasser.

Durch Xylol und Alkohol in destilliertes Wasser und nun entweder:

Direkte Färbung:

Toluidinblau 0,1 prozentige Lösung (aq. dest.) auf 50—60° C. erwärmt für 10 Minuten; dann Abspülen und Wässern 1—2 Minuten. Für einige Sekunden oder Minuten in 1prozentige Lösung von Ammoniummolybdat. Abspülen Alkohol, Xylol, Kanadabalsam (neutraler v. Grübler), oder:

Indirekte Färbung:

Für 5—10 Minuten in eine auf 10—30° C. erwärmte 1—4-prozentige Lösung von Ammoniummolybdat. Dann 5—6 mal kurz

[1]) Mönckeberg und Bethe, Arch. f. mikr. Anat. LIV. 1899.

Abspülen mit dest. Wasser (Spritzflasche). Der Objektträger trockengewischt, Schnitte mit einer 0,05—0,1 prozentigen Toluidinblaulösung überschichtet, für 5 Minuten in Paraffinofen (50—60°) gelegt. Abspülen. Alkohol, Xylol, Balsam.

VI. Allgemeine praktische Bemerkungen zur Bearbeitung des normalen und pathologischen Zentral- und peripherischen Nervensystems.

Die Bearbeitung des Nervensystems, speziell des zentralen, weicht von der der übrigen Organe so wesentlich ab, dass es nötig erscheint, einige Hinweise für die Untersuchung zu geben.

Will man das Material nur für makroskopische Zwecke benutzen, z. B. bei vergleichend anatomischen Untersuchungen des Zentralnervensystems, speziell der Gehirne, so tut man am besten, wenn man letztere in eine 10 prozentige Formollösung einlegt.

Bei grösseren Gehirnen (Mensch. Affe etc.) ist es zweckmässig, gleich in den ersten Tagen nach dem Einlegen in Formol, die Pia mater abzuziehen.

Nach den Erfahrungen, welche wir in unserem Laboratorium gesammelt haben, können die Gehirne jahrelang in der Formollösung verbleiben, ohne dass wesentliche Schrumpfungsprozesse eintreten. Die Form des Gehirns bleibt dabei unverändert, es tritt keine starke Abplattung ein; auch das Gewicht des Gehirns zeigt sich nach fast zweijährigem Aufenthalt in 10 prozentiger Formollösung sehr unwesentlich verändert, wenn das Organ von vornherein frisch war. (Zunahme ca. 1—2 %, wie oben ausgeführt wurde.)

Bei makroskopischer Untersuchung kleinerer Gehirne (Katzen, Kaninchen etc.) bietet die Abziehung der Pia mater gewisse Schwierigkeiten. Will man deshalb die Gehirnwindungen studieren und das Organ selbst eventuell photographieren, so ist es von Vorteil, das frische Gehirn auf 24 Stunden in eine gesättigte wässerige Chlorzinklösung zu bringen; das Gehirn schwimmt zuerst und senkt sich allmählich auf den mit Watte zu belegenden Boden. Nach 24 Stunden zieht sich die Pia leicht von dem etwas geschrumpften Organ ab; alsdann möge das von der Pia befreite Gehirn in Formollösung aufbewahrt werden.

Die Angabe verschiedener Autoren, dass die Farbe der grauen Substanz durch das Formol nicht verändert wird, kann nur für einen

kürzeren Zeitraum gelten (wenige Monate); nach einem längeren Zeitraum verwischt sich der feinere Farbenunterschied zwischen weisser und grauer Substanz, obgleich eine gröbere Differenz auch noch nach 2 Jahren erkennbar bleibt. Man kann auch die Gehirne bekanntlich in Alkohol, Chlorzink sowie gesättigter Kochsalzlösung und anderen Fixationsflüssigkeiten aufbewahren, keine der letzteren hat aber die Vorzüge des Formols.

Zum Zwecke der makroskopischen Demonstration von Gehirn- und Rückenmarksschnitten eignet sich auch die Methode des 2 bis 3 monatlichen Verweilens in Chromsalzen mit nachträglichem Aufbewahren in Alkohol (80—90 %), wobei die gröbere Zeichnung der grauen und weissen Substanz deutlicher als bei Formol auftritt.

Für die mikroskopische Bearbeitung mögen folgende Hinweise dienen:

Jeweilig von dem einzelnen pathologischen Fall hängen die speziellen Methoden der Untersuchung ab.

Im grossen und ganzen kann man sagen, dass bei chronischen, jahrelang dauernden Prozessen hauptsächlich die Weigertsche Methode der Markscheiden- und Neurogliafärbung, sowie die Karminfärbungen, in Betracht kommen, dagegen bei akuteren Erkrankungen die Marchische und die Nisslsche Methode niemals unterlassen werden dürfen.

Ausser bei den ganz chronischen Erkrankungen darf keine Untersuchung als vollständig betrachtet werden, wobei diese beiden letzteren wichtigen Methoden nicht angewandt worden sind.

Auch die Fibrillenfärbung Bielschowskys dürfte wohl jetzt unentbehrlich sein.

Was die Degeneration der Markscheiden anbetrifft, so zeigten die modernen Untersuchungen, dass man bei Anwendung der Marchischen Methode ganz sichere Degenerationen dort finden konnte, wo die Weigertsche Färbung im Stiche liess. In dieser Beziehung dürften die Pathologen an den Satz Mendels denken, dass eine Methode, die ganz Vorzügliches bietet, wenn sie positive Resultate ergibt, nicht als massgebend angesehen werden kann, wenn ihre Resultate negativ ausfallen.

Die Weigertsche Methode gibt uns klare Bilder bei kompakteren und älteren Degenerationen, ist aber weniger massgebend für den frischen Myelinzerfall und für die zerstreutere und lockerere Degene-

ration, deren Darstellung die Domäne der Marchischen Methode darstellt.

Es muss hier jedoch betont werden, dass die Bilder, welche die Marchische Färbung ergibt, mit grosser Kritik und Vorsicht aufzufassen sind, denn zerstreute, ganz locker liegende Schollen, die meist klein und rundlich sind, finden sich auch im normalen Gehirn und Rückenmark dargestellt. Nach Edinger[1]) dürfen wir als sicher annehmen, dass auch der normale periphere Nerv Degenerationsprodukte enthält und spricht deren Lokalisation dafür, dass sie den Nerven mit stärkster Tätigkeit entsprechen, dass sie Zeichen des normalen Zerfalls sind. Deshalb erscheint es wichtig, neben Querschnitten auch Längsschnitte anzufertigen, da gerade die kettenartige Anordnung der Degenerationsschollen für die wirkliche Degeneration sehr charakteristisch ist.

Immerhin jedoch möge man auch bei chronischen Erkrankungen nicht unterlassen, die Marchische Färbung anzuwenden, da ja auch hier pathologische Veränderungen frischeren Datums neben solchen älterer Natur einhergehen können.

Was die Nisslsche Methode betrifft, so ist sie bei älteren, wie namentlich frischeren pathologischen Prozessen angewandt worden. Absolut unentbehrlich aber ist die Nisslsche Methode (und ihre Modifikationen) bei sämtlichen Intoxikations- und Infektionsprozessen, wenn es sich hauptsächlich um die Feststellung der Nervenzellveränderungen handelt; denn sie gibt uns auch heute noch einen gewissen Einblick wenigstens in die strukturellen Veränderungen des Zellleibes und der Protoplasmafortsätze. Die Karminfärbungen, die man an gechromten Stücken anwendet, können niemals einwandsfreie Resultate geben, da die auch sonst spärlichen Veränderungen der Nervenzellen zum grossen Teile als Kunstprodukte der Härtung gedeutet werden können und nicht ganz einwandsfrei sind. Über die Anwendung des Karmins für die Feststellung der feineren strukturellen Veränderungen der Nervenzellen mag hiermit der Stab gebrochen sein.

Einige Beispiele mögen noch zur Erläuterung obiger Bemerkungen dienen.

Handelt es sich um einen Fall von einer vor langer Zeit, z. B. vor Jahren stattgehabten lokalen Verletzung der Nervensubstanz (trau-

[1]) Edinger, Die Aufbrauchkrankheiten des Nervensystems. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 45. 1904.

matisch bedingte Zerstörung der Hirnrinde, alter Bluterguss im Gehirn) und soll danach sekundäre Degeneration festgestellt werden, so wird hier die Weigertsche, event. auch die Karminfärbung anzuwenden, dagegen dürfen von der Marchischen Methode kaum Resultate zu erwarten sein.

Handelt es sich dagegen um ein akutes Leiden. das schnell zum exitus geführt (traumatische Läsion des Gehirns oder Rückenmarks, akute Myelitis, akute Poliomyelitis etc.), so würden hier ausser den üblichen Methoden hauptsächlich Marchis und Nissls Färbungen in Betracht kommen.

Bei chronischen Affektionen des Zentralnervensystems, bei denen immer neue Nachschübe der Krankheit vorkommen können (Multiple Sklerose, Syringomyelie, Bulbärparalyse, amyotrophische Lateralsklerose etc.), müssen ebenfalls neben Weigertscher Färbung auch die Marchische, und neben den Karminfärbungen wiederum die Nisslsche Methode verwendet werden. Diese letztere soll also hauptsächlich dann angewandt werden, wenn es sich um eine durch allgemeine Ursachen bedingte Schädigung der Nervenzellen handeln kann (Infektion, Intoxikation) oder aber, wenn es auf die Feststellung der Erkrankung der Nervenzellen als der Teile der Neurone ankommt (Untersuchung der Nervenkerne bei Amputationen, Neuritiden etc.)

Bei Störungen der geistigen Funktionen, besonders bei chronischen Formen der Geisteskrankheiten (Progressive Paralyse z. B.) soll ausser der Weigertschen und Marchischen Methode zur Feststellung der Myelinfasern die Nisslsche für die eventuelle Feststellung der Nervenzellveränderungen und Weigerts Neurogliamethode zur Feststellung grösserer Defekte der Nervensubstanz und sekundärer Ersatz-Wucherung durch Glia benutzt werden. So hat Weigert[1]) selbst noch in der letzten, wenige Tage nach seinem Tode erschienenen Mitteilung über eine mittels der Neurogliamethode nachgewiesene Kleinhirnveränderung bei Tabes dorsalis berichtet, wobei sich in der Molecularschicht an umschriebenen Stellen die Neurogliafasern in sehr dichter Anordnung fanden. —

Schon aus diesen kurzen Exempeln geht hervor, dass jeder Fall in Bezug auf die hauptsächliche Anwendung der Färbungsmethoden individualisiert werden, dass man sich vor jedem Schematisieren sehr hüten muss, da sonst leicht Wichtiges übersehen werden kann.

---

[1]) Weigert, Neurolog. Zentralbl. Nr. 16. 1904.

Was die mikroskopische Untersuchung des normalen Zentralnervensystems betrifft, so erscheint bei der modernen so verfeinerten Technik das Bedürfnis nach ungefärbten und Zupfpräparaten sehr gering, für das peripherische Nervensystem indessen immerhin noch berechtigter.

Als die empfehlenswertesten Methoden für die Darstellung der einzelnen normalen Bestandteile des Nervensystems erscheinen mir hauptsächlich folgende:

a) Für das Zentralnervensystem.

1. Für die Nervenzellen:
   Nisslsche Methode, Heldsche Methode.
   Karminmethode, besonders die Stückfärbung mit karminsaurem Natron.
   Nigrosinmethode.
   Golgische Methode.
   Ehrlichsche Methylenblaumethode (bei frischem Material).
   Fibrillenfärbung Bielschowskys.
   Eisenhämatoxylinmethode Heidenhains.
2. Für die Markscheiden:
   Weigertsche Methode, besonders in der Modifikation von Kulschitzky-Wolters.
   Karminmethode.
3. Für die Axenzylinder:
   Karminmethode.
   Nigrosinmethode.
   van Giesonsche Methode.
   Ehrlichs Methylenblaumethode (bei frischem Material).
   Fibrillenfärbung Bielschowskys und Cajals.
4. Für die Neuroglia:
   Weigertsche Methode.
5. Für die Kerne:
   Alaunhaematoxylin.

b. Für die peripherischen normalen Nerven.

1. Für die gehärteten Nerven, die oben angeführten Axenzylinder und Markscheidenmethoden.
2. Für die frischen Nerven, die Behandlung mit 1 prozentiger Osmiumsäure und Zerzupfen in Glyzerin (Markscheide), oder Argent. nitricum-Lösung und ebenfalls Zerzupfen in Glyzerin.

Literatur.

Boehm und Oppel, Taschenbuch der mikroskopischen Technik, 1900.
Edinger-Wollenberg, Jahresberichte (Virchow-Hirsch).
Encyklopädie der Mikroskopischen Technik, 1903.
Fol, Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie, 1896.
Goodall, The microscopial examination of the humain brain. London 1894.
Jacobsohn, Untersuchungsmethoden des Nervensystems. Handbuch der patholog. Anat. des Nervensystems 1903.
Israel, Praktikum der pathologischen Histologie.
von Kahlden, Technik der histologisehen Untersuehung pathologisch-anatomiseher Präparate, 1904.
Lee und Mayer, Grundzüge der mikroskopischen Technik, 1900.
Loewenthal, Handbuch der Färberei der Spinnfasern, 1895.
Mercier, Les coupes du système nerveux central, Paris 1894.
Michaelis, Einführung in die Farbstoffchemie, 1902.
Pappenheim, Grundriss der Farbchemie zum Gebrauch bei mikroskopischen Arbeiten, 1901.
Pollack, Anatomische Untersuchungsmethoden. Jahresbericht für Neurologie, 1897—1903.
Ranvier, Technisches Lehrbueh der Histologie, 1888.
Rawitz, Leitfaden für histologische Untersuchungen, 1895.
Stöhr, Lehrbuch der Histologie und der mikroskopischen Anatomie des Menschen mit Einschluss der mikroskopischen Technik, 1901.
Weigert, Technik (Merkel-Bonnet, Ergebnisse der Anatomie und Entwickelungsgeschichte 1893, 1895).

Register.

A.

Adamkiewicz, Markscheidenfärbung 104.
Äquivalentpräparate 66.
Äthylendiamin 129.
Ätzkali-Alkohol 117.
Alaun-Carmin 51.
— Cochenille 55.
— Hämatoxylin 57.
Albrecht 30.
Alkohol 18.
Allerhand, Markscheidenfärbung 108.
Altmann, Mitosendarstellung 77.
Ammoniak-Carmin 50, 52.
Anglade, Neurogliafärbung 141.
Anilinblau 60, 120.
Anilin-Blue-Black 59, 120.
Anilinkombinationen 61.
Anilinfärbungen 59.
Apáthy, Nachvergoldung 125.
— Serienschnitte 33.
— Stückfärbung 59.
— Vitale Färbung 95.
Aronson 90, 94, 109.
Arnstein 90, 94.
Aufkleben der Paraffinschnitte 29.
Axenzylinderfärbung 113.
— nach Benda 118.
— „ Ellermann 121.
— „ Fajersztajn 121.
— „ Freud 115.
— „ Gerlach 115.
— „ van Gieson 116.
— „ Kaplan 123.
— „ Mallory 118.
Axenzylinderfärbung
— nach Paladino 119.
— „ Platner 148.
— „ Sahli 120.
— „ Schmaus 119.
— „ Strähuber 121.
— „ Stroebe 117.
— „ Upson 113.
Azoulay, Markscheidenfärbung 107.
— Nervenzellenfärbung 73.

B.

Beale, Ammoniak-Carmin 50.
Becker, Neurofibrillenfärbung 128.
Benda, Eisenhämatoxylinfärbung 118.

Bendas Flüssigkeit 21.
Benda, Markscheidenfärbung 107, 149.
— Neurogliafärbung 140.
Beneke, Neurogliafärbung 142.
Benzo-Purpurin 62.
Bergamottöl 40.
Berliner, Plastische Reproduktion 13.
Bethe, Fixierung (Vitale Färbung) 90.
— Molybdänverfahren 126.
— Peripheres Nervensystem 149.
Bevan-Levis 59.
Bielschowsky, Nervenzellenfärbung 69.
— Neurofibrillenfärbung 128.
Biondi-Ehrlichs Gemisch 61.
Bleu de Lyon 60.
Blum 15.
Boehmers Hämatoxylin 57.
Boll 115.
Bolles-Lee 19.
Borax-Carmin 51, 52.
Borchert, Markscheidenfärbung 108.
Braune Chrombeize (Weigert) 17.
Broca 5, 6, 12.
Brodmann 110.
Buschan 6.

C.
(Siehe auch K und Z.)

Cajal, Collateralenfärbung 92.
— Golgis Färbung 80.
— Neurofibrillenfärbung 130.
Cajeputöl 40.
Canadabalsam 41.
Carbolxylol 40.
Carminfärbungen 50.
Carminsaures Natron 51.
Carnoy - Gehuchtens Gemisch 21.
Cedernöl 40.
Celloidin 25.
Celloidin-Paraffin-Methode 29.
Chevreul 56.
Chromalaun 99.
Chromogen 138.
Chromosmiumessigsäure 20.
Chromsilbermethode 79.
Cochenille 50.
Coeruleïn S. 119.
Cohnheim 116.
Collateralenfärbung 92.
Collodionage des surfaces 36.
Colloxylin 27.
Colophonium 41.
— Terpentinlack 139.
Congorot 61.
Conservierungsmethoden 7.
Cox, Fibrillenfärbung 71.
— Golgis Färbung 84.
Cresylviolett 69.
Csokors Alauncochenille 55.

D.

Dahlia 60.
Dammarlack 41.
Darkschewitsch, Serienschnitte 35.
Déjerine 1.
Delafields Hämatoxylin 57.
Dogiel, Fixierung 90.
— Vitale Färbung 94.
Döllken, Seifeneinbettung 30.
Donaldson, Gehirngewicht 42.
Doppelfärbungen 61.
Doppelte Methode 23, 85.
Dreifarbgemisch 61, 74.
Duval, Collodionage 36.

E.

Edinger 44, 45.
Ehrlich, Dreifarbgemisch 61.
— Säure - Hämatoxylin 58.
— Vitale Färbung 89.
— „ „ Bethes Modifikation 91.
— Vitale Färbung, Cajals Modifikation 92.
Ellermann, Axenzylinderfärbung 121.
Einbettung 25.
Eisenhämatoxylin 58, 98, 118.
Eosin 61, 62.
Erdmann 56.
Erlitzkys Flüssigkeit 17.
Ernst 117.
Erythrosin 70.
Exner, Markscheidenfärbung 104.

F.

Fajersztajn, Axenzylinderfärbung 121.
Färbungsmethoden 46.
Färbung der Axenzylinder 113.
Färbung der Markscheiden 47.
— „ Nervenzellen 50.
— „ Neurofibrillen 125.
— „ Neuroglia 136.
Fengvessy 77.
Fibrillenfärbung 125.
Fixierungsflüssigkeiten 15.
Flatau, Golgis Färbung 87.
— Längsschnitte 37.
— Photographie 45.
Flemmings Gemisch 20.
— Gemisch, Fols Modifikation 20.
— Gemisch, Friedmanns Modifikation 20.
Flesch 12.
Fliesspapierabtrocknung 40.
Fluorchrom 99.
Formalin (Formol) 15.
Franke 29.
Französische Methode (Gehirnsektion) 3.
Freud, Axenzylinderfärbung 115.

G.

Gad 145.
Galleïn 109.
Gefriermethode 31.
Gehirngewicht 5.
Gehirnschnitte, grosse 35.
Gehirnsektion 1.
Gentianaviolett 60.
Gerlach 50, 115.
Gerota 16.
Gewichtsveränderung des Gehirns 42.
Giacominis Methode 10.
van Giesons Färbung 116.
Glimmer 36.
Glyzerin 41.
Goldfärbung nach Cohnheim 116.
— nach Freud 115.
— „ v. Frey 146.
— „ Gerlach 115.
— „ Ranvier 146.
— „ Upson 113.
Goldfixagebad 81.
Goldscheider 64.
Golgis Färbung 79.
— — Coxs Modifikation 84.
— — Flataus Modifikation 87.
— — Flechsigs Modifikation 82.
— — Golgis Modifikation 81, 87.

GolgisFärbung,KopschsModifikation 86.
— — ObregiasModifikation 82.
— — Ziehens Modifikation 83.
Golginetze 87, 126.
Grenachers Alauncarmin 51.
— Boraxcarmin 52.
Greppin 86.
Gudden 82.
Gulland 29.

H.

Hämateïn 56.
Hämatoxylin 56.
Hämatoxylin-Alaun 57.
— Eosin 62.
Härtungsflüssigkeiten 15.
Hamiltons Einbettung 32.
Harze 39.
Haugs Carmin 51.
— Hämatoxylin 58.
Heidenhains Einbettung 28, 29.
— Stückfärbung 58.
— Eisenhämatoxylinfärbung 69.
Held, Nervenzellenfärbung 70.
Heller, Osmierung 147.
Holz 33.
Hoyers Ammoniak-Carmin 53.
— Nervenzellenfärbung 68.
Hydrochinon 131.

I. (J.)

Jacobsohn, Plastische Reproduktion 13.
Indamin 68.
Indulin 60, 120.
Jordan 26.
Jores 9.
Isolation 24.

K.
(Siehe auch C.)

Kadyi 55.
Kaiserlings Flüssigkeit 9.
Kaiser, Markscheidenfärbung 103.
Kaplan, Axenzylinderfärbung 123, 124.
Karbolxylol 40.
Karminfärbungen 50.
Karyokinesendarstellung 76.
Kernfärbungen 50.
Kolophonium 41.
Konservierungsmethoden 7.
Kopsch 86.
Kork 33.
Krause 87.
Kronthal, Nervenzellenfärbungen 73, 74.
Kulschitzky, Markscheidenfärbung 101.
— Neurogliafärbung 142.
Kupffer 125.

L.

Längsschnitte des R.-M. n. Flatau 37.
Laskowskis Methode 11.
Lenhosséks Gehirnkonservierung 12.
— Nervenzellenfärbung 68, 76.
Lissauer, Gehirnschnitte 35.
Lithion-Carmin 54.
Löwenthals Carmin 54.
Löwitts Färbung der motorischen N.-endigungen 148.
Lustgartens Reduktion 100.

M.

Macdonald 85.
Maceration 24.
Mallory, Axenzylinderfärbung 118.
Marchis Färbung 105.
Marinas Fixation 17.
Markierung der Stücke 25.
Markscheidenfärbung (cf. Weigert) 97.
— n. Adamkiewicz 104.
— „ Allerhand 108.
— „ Aronson 109.
— „ Borchert 108.
— „ Exner (Pal) 104.
— „ Fränkel 109.
— „ Heller 105.
— „ Marchi 105.
— „ Mosse 109.
— „ Schrötter 110.
— „ Weigert 97.
Mayers Eiweissglyzerin 29.
Melnikow-Raswedenkow 8.
Mercier 19.
MerksMitosendarstellung 76.
Merkels Flüssigkeit 21.
Methylenblau 60.
— Methode (Vital) 89.
Methylgrün 61.
Methylviolett 60.
Meyer S. 94.
Meyer, Neurofibrillenfärbung 128.
Meynert, Gehirnsektion 4.
Mies 5.
Mikrotome 32.
Mikrotommesser 33.
Minor 117.
Mitosendarstellung 76.
Mönckeberg 149.
Mosse, Markscheidenfärbung 109.
— Nervenzellenfärbung 75.
Müllersche Flüssigkeit 17.

N.

Nachvergoldung (Apáthy) 125.
Natronseifeneinbettung 30.
Nebelthau 39.
Negropenzil 25.
Nelkenöl 40.
Nervenendigungen 145.
Nervenzellenfärbung 50, 61.
— n. Azoulay 73.
— „ Bielschowsky-Plien 69.
— „ Cox 71.
— „ Heidenhain 69.
— „ Held 70.
— „ Hoyer 68.
— „ Kronthal 73, 74.
— „ Lenhossék (Toluidinblau) 68.
— „ Mosse 75.
— „ Nissl 64, 67.
— „ Rehm 73.
— „ Roncoroni 72.
— „ Rosin 70, 75.
— „ Weigert (Thionin) 68.
Neurofibrillenfärbung 125.
— n. Apáthy 125.
— „ Becker 128.
— „ Bethe 126.
— „ Bielschowsky 128.
— „ Cajal 130.
— „ Meyer 128.
Neurogliafärbung 136.
— n. Anglade 141.
— „ Benda 140.
— „ Beneke 142.
— „ Kulschitzky 142.
— „ Mallory 118.
— „ Weigert 136.
— „ Yamagiva 143.
Neurokeratingerüst 124.
Neutralrot 70.
Nigrosinfärbung 120.

Nikoforoffs Borax-Carmin 52.
Nissl, Nervenzellenfärbungen 64, 67.
Nothnagel, Gehirnsektion 3.

O.

Obersteiner 5, 6, 148.
Obregias Serienschnitte 33.
Öle 39.
Ogle 7.
Ohlmacher 22.
Origanumöl 40.
Orths Lithion-Karmin 54.
— Mischung 16.
— Pikrolithion-Karmin 54.
Osmiumsäure 20.

P.

Pals Gehirnschnitte 35.
— Modifikation 100.
Paladino, Axenzylinderfärbung 119.
Paraffin 27.
Peripherisches Nervensystem 145.
Photographie 44.
Photoxylin 27.
L. Picks Flüssigkeit 9.
Pigmentfärbung 76.
Pikrokarmin 54.
Pikrolithionkarmin 54.
Pikrinsäure 116.
Pitres Gehirnsektion 3.
Plastische Reproduktion 13.
Platner, Axenzylinderfärbung 148.
Plien, Nervenzellenfärbung 69.
Polarisation 110.
Polumordwinow 69.

R.

Rabls Flüssigkeit 21.
Ranviers Goldfärbung 146.
— Pikrokarmin 54.
Rawitz 119.
Rehms Färbung 73.
Retzius Gehirnkonservierung 12.
Robertson 84.
Roncoronis Färbung 72.
Rosenbach 12.
Rosin 70, 74, 77.
Rothmann 77.

S.

Sadorsky 65.
Safranin 60.
Sahli, Axenzylinderfärbung 120.
Salpetersäure 21.
Salzsaures Karmin 55.
Säure Fuchsin 98.
— Hämatoxylin 58.
Schaffers Modifikation 102.
Scharlachrot 107.
Schema für Einbettung 31.
Schiefferdecker 25.
Schmaus (Urankarmin) 53.
Schoebel 25.
Schultze 125.
Schwalbe 12.
Schwefelkohlenstoff-Einbettung 28.
Sehrwald 86.
Serienschnitte n. Apáthy 33.
— n. Obregia 33.
— „ Weigert 33.
Signieren der Präparate 25.
Sihler, Färbung der Nervenendigungen 145.
Smirnow 90, 94.
Soda Pikro-Karmin 54.
Spalteholz 28.
Spinalganglienfärbung 69, 76.
Stabilit 33.
Stiedas Methode 11.
Stöhrs Formel 18.
Störk 30.
Strähuber, Axenzylinderfärbung 121.
Strasser 29.
Stroebe, Axenzylinderfärbung 117.
Stückfärbung 23, 50, 58.
Sublimat 19.
Sudanrot 77.

T.

Tal 86.
Terpentin 40.
Thioninfärbung 68.
Toluidinblau 60, 68.
Thurnham 5.
Triazidfärbung 74.

U.

Überosmiumsäure 20.
Unna 72.
Upson, Axenzylinderfärbung 113.
Urankarmin 53.

V.

Valentins Doppelmesser 33.
Vassales Färbung 102.
Veratti 87.
Viktoriablau 60.
R. Virchows Gehirnsektion 2.
H. Virchow 23.
Vitale Färbung 89.

W.

Waldeyer 56.
v. Walsem 6.
Weigerts braune Chrombeize 17.
— Carbolxylol 40.
— Darstellung der Karyokinese 76.
— Eisenhämatoxylin 98.
— Färbungsprinzipien 48.
— Gehirnsektion 4.
— Markscheidenfärbung 97.
— —, Kaisers Modifikation 103.
— —, Kulschitzkys Modifikation 101.
— —, Lissauers Modifikation 102.
— —, Pals Modifikation 100.
— —, Schäfers Modifikation 102.
— —, Vassales Modifikation 102.
— —, Wolters Modifikation 102.
— Neurogliafärbung 136.
— Serienschnitte 33.
Welckers Kubierungsmethode 7.
Wolters Modifikation 102.

X.

Xylol 40.
Xylol-Anilin 139.

Y.

Yamagiva, Neurogliafärbung 143.

Z.

Zanke 7.
Zedernöl 40.
Zeichenapparat nach Edinger 44.
Zelloidin 25.
Zenkersche Lösung 19.
Ziehens Färbung 83.



